

# **Multifunktionale DNA Kassetten zur konditionalen Mutagenese in der Maus**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina  
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer  
Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Karina Maria Nawrath  
aus Groß-Strehlitz

1. Referent:  
2. Referent:  
eingereicht am:  
mündliche Prüfung (Disputation) am:  
Druckjahr 2008

Professor Dr. Jürgen Wehland  
Professor Dr. Stefan Dübel  
30.04.2008  
16.07.2008

## **Vorveröffentlichungen der Dissertation**

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

## **Tagungsbeiträge**

Nawrath, K., Müller, W. und Hafner M.: A dual use cassette for subsequent expression of hormone dependent and constitutively active cre recombinase. (Vortrag). 5<sup>th</sup> Workshop on Innovative Mouse Models (IMM 2007), Juni, 2007, Leiden, Niederlande

Nawrath, K., Müller, W. und Hafner M.: A dual use cassette for subsequent expression of hormone dependent and constitutively active cre recombinase. (Poster). 5<sup>th</sup> Workshop on Innovative Mouse Models (IMM 2007), Juni, 2007, Leiden, Niederlande

Hafner, M., Nawrath, K., Kochut, A. und Müller, W.: Towards one step cloning of multi-purpose targeting constructs. (Poster). 5<sup>th</sup> Workshop on Innovative Mouse Models (IMM 2007), Juni, 2007, Leiden, Niederlande

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Zielsetzung .....	1
1.2 Allgemeine Einleitung .....	1
1.3 Transgene Mäuse .....	2
1.4 Konventionelles <i>gene targeting</i> .....	2
1.5 Konditionales <i>gene targeting</i> .....	4
1.5.1 Sequenzspezifische Rekombinationssysteme .....	4
1.5.2 Konditionale <i>gene targeting</i> Strategien .....	10
1.5.3 Systeme zur Expression sequenzspezifischer Rekombinasen.....	13
1.6 Induzierbare Rekombinase Systeme .....	14
1.6.1 Transkriptionelle Kontrolle der Rekombinase Aktivität .....	15
1.6.2 Posttranslationelle Kontrolle der Rekombinase Aktivität .....	15
1.6.2.1 Fusionen von Rekombinasen mit Liganden bindenden Domänen.....	15
1.6.2.1.1 Fusionen von Rekombinasen mit Liganden bindenden Domänen von Östrogenrezeptoren .....	17
1.6.2.1.2 Fusionen von Rekombinasen mit Liganden bindenden Domänen von Progesteronrezeptoren.....	19
1.7 <i>Gene trapping</i> .....	20
1.7.1 Konventionelle <i>trapping</i> Vektoren .....	20
1.7.2 Konditionale <i>gene trapping</i> Vektoren .....	23
1.8 <i>Nonsense mediated mRNA decay (NMD)</i> .....	25
1.9 Aufgabenstellung .....	26
<b>2. Ergebnisse.....</b>	<b>30</b>
2.1 Bifunktionale Cre Expressionskonstrukte.....	30
2.1.1 Bifunktionale Cre Expressionskonstrukte mit multiplen Liganden bindenden Domänen.....	30
2.1.1.1 Bifunktionale Cre Expressionskonstrukte mit multiplen ERT2 Domänen .....	31
2.1.1.2 Bifunktionales Cre Expressionskonstrukt mit ERT2 und PR Domänen .....	34
2.1.2 Bifunktionales Cre Expressionskonstrukt mit einer ERT2 Domäne (konstitutiv aktiv zu regulierbar) .....	36
2.1.3 Untersuchung der Funktionalität der Rekombinase Zielsequenzen.....	37
2.1.4 Funktionsanalysen der induzierbaren und konstitutiv aktiven Cre Fusionsrekombinasen.....	41
2.1.4.1 Bestimmung der Cre Aktivität mittels lacZ Färbung.....	42
2.1.4.2 Bestimmung der Cre Aktivität mit Hilfe des Dual-Light® Systems .....	43
2.1.5 Generierung eines BAC Transgens mittels ET Rekombination .....	49
2.2 Co-Expression von Genen mittels 2A "CHYSEL" Technologie.....	53

<b>2.3 Induzierbare NMD Kassetten zur konditionalen Mutagenese.....</b>	<b>56</b>
2.3.1 Strategie zur Herstellung einer induzierbaren NMD Kasette .....	56
2.3.2 System zur Untersuchung der Funktion von induzierbaren NMD Kassetten .....	58
2.3.3 $\beta_7$ -Integrin Gen basierende induzierbare NMD Kasette.....	60
2.3.3.1 Funktionsanalysen der $\beta_7$ -Integrin Gen basierenden induzierbaren NMD Kassetten.....	61
2.3.4 Retinoblastom Gen basierende induzierbare NMD Kassetten .....	63
2.3.4.1 Funktionsanalysen der Retinoblastom Gen basierenden induzierbaren NMD Kassetten.....	64
2.3.4.2 Funktionsanalysen der modifizierten Retinoblastom Exon 23 basierenden induzierbaren NMD Kassetten.....	66
2.3.5 Kombinierte induzierbare NMD polyA Kassetten .....	68
2.3.5.1 Funktionsanalysen der kombinierten induzierbaren NMD polyA Kassetten.....	69
2.3.6 Untersuchung der Funktionalität der Rekombinase Zielsequenzen.....	71
2.3.7 Untersuchung der Funktionalität von induzierbaren NMD Kassetten mittels stabiler Transfektion .....	72
<b>3. Diskussion und Ausblick .....</b>	<b>77</b>
<b>3.1 Bifunktionale Cre Expressionskonstrukte.....</b>	<b>77</b>
3.1.1 Die Rekombinase Zielsequenzen sind funktionell .....	78
3.1.2 Cre vermittelte Aktivität der bifunktionalen Expressionskonstrukte kann mittels Dual-Light® System bestimmt werden .....	79
3.1.3 Konstrukte mit multiplen LBDs zeigen ein schlechtes Signal-zu-Rausch Verhältnis.....	79
3.1.4 Induzierbare Konstrukte mit einer ERT2 LBD zeigen ein gutes Signal-zu-Rausch Verhältnis.....	82
3.1.5 Schlussfolgerung .....	83
3.1.6 Die Herstellung eines BAC Transgens mittels ET Rekombination.....	84
3.1.7 Ausblick .....	85
<b>3.2 Co-Expression von Genen mittels 2A "CHYSEL" Technologie.....</b>	<b>86</b>
<b>3.3 Induzierbare NMD Kassetten zur konditionalen Mutagenese.....</b>	<b>87</b>
3.3.1 Die durch NMD Kassetten induzierte Inaktivierung der Luciferase Aktivität kann mittels Dual-Luciferase® Reporter Assay System bestimmt werden ....	88
3.3.2 NMD Kassetten zeigen Unterschiede in der Wirkung der NMD vermittelnden Exons auf die Luciferase Aktivität .....	89
3.3.3 Rekombinase Erkennungssequenzen beeinflussen die NMD vermittelnde Wirkung der NMD Kassetten .....	91
3.3.4 Kombinierte induzierbare NMD polyA Kassetten zeigen keine verbesserte NMD vermittelnde Wirkung.....	92
3.3.5 Nur lox66/71 aber nicht FRT LE/RE Rekombinase Zielsequenzen sind für Inversionsstrategien geeignet .....	93
3.3.6 Schlussfolgerung .....	94
3.3.7 Emetine führt zum Zelltod von ES-Zellen.....	94
3.3.8 NMD Kassetten als Bestandteil von <i>gene targeting</i> Kassetten.....	96
3.3.9 NMD Kassetten als Bestandteil von <i>gene trapping</i> Kassetten.....	97
3.3.10 Ausblick .....	101
<b>4. Zusammenfassung .....</b>	<b>103</b>

<b>5. Material und Methoden .....</b>	<b>105</b>
<b>5.1 Chemikalien allgemein .....</b>	<b>105</b>
<b>5.2 Materialien für die Zellkultur .....</b>	<b>105</b>
<b>5.3 Zelllinien .....</b>	<b>105</b>
<b>5.4 Verwendete Medien, Lösungen und Puffer in der Zellkultur .....</b>	<b>106</b>
<b>5.5 Methoden in der Zellkultur .....</b>	<b>107</b>
5.5.1 Einfrieren und Auftauen von Zellen .....	107
5.5.2 Splitten und Expandieren von Zellen .....	107
5.5.3 Zellzahlbestimmung .....	107
5.5.4 Transiente Transfektion von Nierenzellen .....	107
5.5.5 Stabile Transfektion von ES-Zellen .....	108
5.5.6 Isolierung von ES-Zellklonen .....	109
5.5.7 Einfrieren von 96-Loch Platten mit ES-Zellklonen .....	109
5.5.8 Zelllyse und anschließende DNA Aufarbeitung aus ES-Zellklonen .....	109
5.5.9 Hemmung der Protein Biosynthese mittels Emetine .....	110
<b>5.6 lacZ Färbung .....</b>	<b>110</b>
5.6.1 Lösungen .....	111
<b>5.7 Reporter Assays zur Bestimmung von Reporter gen Aktivitäten .....</b>	<b>111</b>
5.7.1 Dual-Light® System .....	111
5.7.2 Dual-Luciferase® Reporter Assay System .....	111
<b>5.8 Molekularbiologische Standardmethoden .....</b>	<b>112</b>
5.8.1 Verwendete Puffer .....	112
5.8.2 Isolierung von DNA .....	112
5.8.3 Restriktionsverdau .....	112
5.8.4 Agarosegelelektrophorese .....	112
5.8.5 Polymerase Kettenreaktion (PCR) .....	113
5.8.6 Herstellung eines Polylinkers .....	113
5.8.7 Aufreinigung von DNA aus einem Agarosegel .....	113
5.8.8 Klassische Klonierung von DNA Fragmenten, PCR Produkten sowie ET Klonierung .....	114
5.8.9 Isolierung von DNA Sonden .....	115
5.8.10 Southern Blot und Hybridisierung .....	115
5.8.11 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden .....	115
<b>5.9 Bakterien .....</b>	<b>116</b>
5.9.1 Medien für Bakterien .....	116
5.9.2 <i>Escherichia coli</i> Zelllinien .....	116
5.9.3 Transformation von Bakterien .....	116
5.9.4 Verwendete Antibiotika Lösungen .....	117
<b>5.10 Verwendete BACs, genomische DNA und Plasmide .....</b>	<b>117</b>
<b>6. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>120</b>

<b>7. Anhang.....</b>	<b>129</b>
<b>7.1 Primer für bifunktionale Cre Expressionskonstrukte .....</b>	<b>129</b>
7.1.1 Sequenzierungsprimer.....	129
<b>7.2 Primer für ET Rekombination .....</b>	<b>130</b>
<b>7.3 Primer für bicistronische Expressionsvektoren .....</b>	<b>130</b>
<b>7.4 Oligonukleotide für die Herstellung des Polylinkers .....</b>	<b>130</b>
<b>7.5 Primer für induzierbare NMD Kassetten .....</b>	<b>130</b>
<b>7.6 Sequenz des Fragments, das Erkennungssequenzen zur Rekombinase         vermittelten Inversion der NMD Kassetten enthält .....</b>	<b>132</b>
<b>7.7 Sequenz der kombinierten induzierbaren NMD Kassetten.....</b>	<b>132</b>
7.7.1 NMD polyA 1 .....	132
7.7.2 NMD polyA 2 .....	133
<b>7.8 Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>134</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Generierung unterschiedlicher DNA Konstrukte zur Cre Rekombinase Expression sowie DNA Kassetten zur konditionalen Mutagenese in eukaryotischen Zellen und in der Maus.

## 1.2 Allgemeine Einleitung

Nach Angaben des *International Human Genome Sequencing Consortium* (IHGSC) kodiert das humane Genom für etwa 20.000 bis 25.000 Proteine [1]. Hinreichende Informationen über Expression oder Funktion sind jedoch nur von geschätzten 15% der Gene verfügbar [2]. Eine große Herausforderung für die Wissenschaft besteht darin zu erforschen, welche molekularen Mechanismen und Wege der Entwicklung zugrunde liegen und welche Gene zum Auslösen von Krankheiten und Behinderungen beitragen. Um die Funktion eines humanen Gens zu erforschen, wird ein Modelorganismus benötigt, in dem die Rolle und Expression des homologen Gens analysiert werden kann. Zu den bekanntesten in der Forschung verwendeten Modellorganismen zählen der Nematode *Caenorhabditis elegans*, die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*, der Zebrafisch *Danio rerio*, der Krallenfrosch *Xenopus laevis*, das Huhn *Gallus gallus* und die Hausmaus *Mus musculus*. Die Maus stellte sich aufgrund ihrer anatomischen, physiologischen und genetischen Ähnlichkeit zum Menschen als ein besonders geeignetes Modellsystem für Genanalysen und für die Entwicklung menschlicher Krankheitsmodelle heraus [3]. Unter allen Modellorganismen ist die murine Immunologie, Neurobiologie, Fortpflanzung, das Verhalten und zuletzt auch die Epigenese den entsprechenden Vorgängen im Menschen am Ähnlichsten. Zusätzlich bietet die Maus den großen Vorteil, dass in ihrem Genom für fast jedes humane Gen das entsprechende homologe Gegenstück identifiziert werden konnte. All diese Kriterien bewegten die Wissenschaftler dazu, das Genom der Maus mit molekularen Mitteln zu manipulieren. Heute sind Mausgenetiker in der Lage, Gene in der gesamten Maus oder nur in speziellen Geweben oder Zelltypen auszuschalten oder zu überexprimieren, große Stücke fremder DNA ins Mausgenom einzubringen und vieles mehr. In den vergangenen Jahren wurden neue Methoden vorgestellt, zu deren Entwicklung die Sequenzierung des Mausgenoms beigetragen hat, die die Möglichkeiten, Mausmodelle für menschliche Erkrankungen zu entwickeln, erweiterten.



### 1.3 Transgene Mäuse

Die ersten genetisch modifizierten Mäuse wurden erzeugt, indem ein linearisiertes DNA Fragment (Transgen) in den männlichen Vorkern von befruchteten Oozyten, die aus Spenderweibchen stammen, injiziert wurde. Anschließend wurden die mittels Mikroinjektion veränderten Oozyten in scheinträchtige Empfängertiere implantiert, die Nachkommen hervorbrachten, die die transgene DNA ins Genom integriert hatten. Die Modifikation liegt in allen aus dem befruchteten Ei hervorgegangenen Zellen und wird demzufolge auch an die Nachkommen der aus der Manipulation resultierenden Tiere übertragen [4, 5]. Ein transgenes Konstrukt besteht aus einem ausgewählten *enhancer* und/oder Promotor, der cDNA des interessierenden Gens, das gewebespezifisch oder zu einem bestimmten Entwicklungszeitpunkt exprimiert werden soll, sowie einem Polyadenylierungssignal (polyA). Da die Insertion des Transgens zufällig erfolgt, können unerwünschte Nebenwirkungen auftreten und Analysen erschweren [6]. Die Möglichkeit, dass ein endogenes Gen durch eine zufällige Insertion eines Konstrukts in zwei Teile getrennt und somit inaktiviert wird, birgt das Risiko, dass ein mutanter Phänotyp entstehen kann, der nicht durch die Expression des Transgens hervorgerufen wurde [7]. Eine Alternative zur Herstellung transgener Tiere liegt im Einbringen von genetisch veränderten murinen embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) (pluripotente Zellen, die aus der inneren Zellmasse von Blastozysten isoliert wurden) in das Blastozöl von Mausembryonen. Die erfolgreiche Isolierung und Kultivierung von murinen ES-Zellen [8], ihre Eigenschaft, dass sie selbst nach verlängerter Kultivierung in Zellkultur die Keimbahn der Maus besiedeln [9] und dass sie zur genetischen Manipulation und anschließender Mikroinjektion in Blastozysten genutzt werden können [10], waren ausschlaggebend für die Entwicklung der *gene targeting* Technologie (siehe unten).

### 1.4 Konventionelles *gene targeting*

Das *gene targeting* bezeichnet die gezielte Mutagenese von Genen mittels homologer Rekombination (HR). Der Vorteil dieser Methode gegenüber der DNA Mikroinjektion liegt im präzisen Austausch von genomischen Sequenzen. Thomas und Capecchi gelang mit der Manipulation des Hypoxanthin-guanin-phosphoribosyltransferase (*HPRT*) Gens das erste *gene targeting* in ES-Zellen [11]. Mario R. Capecchi wurde im Jahr 2007 zusammen mit Martin J. Evans und Oliver Smithies für die Arbeit über "Prinzipien, spezifische Genmodifikationen in Mäusen mit Hilfe embryonaler Stammzellen" mit dem Nobelpreis für Physiologie und Medizin geehrt. Diese Arbeiten waren ausschlaggebend für die Entwicklung der gezielten Mutagenese bei Mäusen.

Das *gene targeting* setzt sich im Wesentlichen aus zwei Grundschritten zusammen. Im ersten Teil wird ein Konstrukt, das Sequenzhomologien zum Zielgen und einen positiven Selektionsmarker enthält, der eine Identifizierung von ES-Zellen ermöglicht, die das Konstrukt stabil in ihr Genom integriert haben, mittels homologer Rekombination in ES-Zellen eingeführt. Diese werden dann im Selektionsmedium kultiviert. Nachdem das modifizierte Allel in den resistenten Zellen nachgewiesen worden ist, werden sie in Blastozysten injiziert und in den Uterus von scheinträchtigen Ammen transferiert. Nach der Injektion in Blastozysten sind ES-Zellen in der Lage alle Gewebe des Mausembryos zu besiedeln, so dass chimäre Nachkommen entstehen können. Die Chimären müssen anschließend mit Wildtyp Mäusen verpaart werden, um feststellen zu können, ob während der Embryoentwicklung aus den genetisch veränderten ES-Zellen Keimbahnzellen hervorgegangen sind und um Nachkommen zu erhalten, die für die Mutation heterozygot sind. Heterozygoten Tiere werden dann miteinander verpaart, um homozygote Mäuse generieren zu können, an denen die Funktion des mutierten Gens studiert werden kann. Diese Technologie ermöglicht die gezielte Inaktivierung von endogenen Genen (*knock-out*), die Insertion neuer ausgewählter Gene oder DNA Fragmente in einen bestimmten Locus unter die Kontrolle eines endogenen Promoters (*knock-in*), sowie Veränderungen wie Punktmutationen und chromosomale Neuordnungen [6].

Die bekannteste Strategie beim *gene targeting* ist die Inaktivierung eines Zielgens, indem ein Exon eines Zielgens durch einen Selektionsmarker ersetzt wird oder indem ein Selektionsmarker in ein Zielgen eingebracht wird. Dazu werden *targeting* Vektoren entworfen, die mit dem spezifischen chromosomalen Locus rekombinieren und diesen mutieren. Das konventionelle *gene targeting* hat den Nachteil, dass der Selektionsmarker nach erfolgter HR innerhalb des Ziellocus zurückbleibt. Da die meisten Selektionskassetten einen Promotor oder *enhancer* und ein polyA Signal enthalten, können diese regulatorischen Elemente das normale Spleißen stören und mit der Transkription des Zielgens oder benachbarten Gene interferieren [12]. Die veränderte Expression führt dann unter Umständen zu einer hypomorphen Mutation des Zielgens [13] oder zur Entstehung eines Phänotyps, der sich nur schwer interpretieren lässt [14, 15]. Ein weiteres mit diesem System verbundenes Problem ist, dass einige Gene während der Embryogenese essentiell sind. Weil Gene in unterschiedlichen Stadien der Ontogenese sowie in verschiedenen Zelltypen oder Geweben ihre Funktion ausüben, lässt sich mit der *gene targeting* Strategie nur die früheste aber nicht spätere Rollen eines Gens untersuchen. Etwa 14 % der durch das *gene targeting* veränderten Gene sind für die Entwicklung notwendig und führen zu embryonal letalen Phänotypen, wenn sie an die Keimbahn weitergegeben werden, so dass eine präzise postnatale Analyse der Genfunktion ausgeschlossen ist [16]. Um diese Nachteile zu umgehen, wurde das

konditionale *gene targeting* entwickelt, das gleichzeitig die Entfernung der Selektionskassetten sowie eine Aktivierung oder Inaktivierung der Genexpression *in vivo* in einzelnen Zellen oder Geweben und/oder zum bestimmten Entwicklungszeitpunkt ermöglicht und dadurch eine embryonale Letalität, die durch die Mutation des Gens hervorgerufen werden könnte, verhindert.

## 1.5 Konditionales *gene targeting*

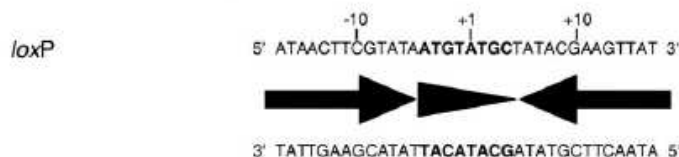
Konditionales *gene targeting* wird in der Maustechnologie eingesetzt, um die Expression von Genen gewebe- und/oder zeitspezifisch zu kontrollieren. Diese Technologie zur *in vivo* Mutagenese beruht auf der Funktion von sequenzspezifischen Rekombinationssystemen, die die Anwendungsmöglichkeiten des *gene targeting* in ES-Zellen erheblich erweitert haben.

### 1.5.1 Sequenzspezifische Rekombinationssysteme

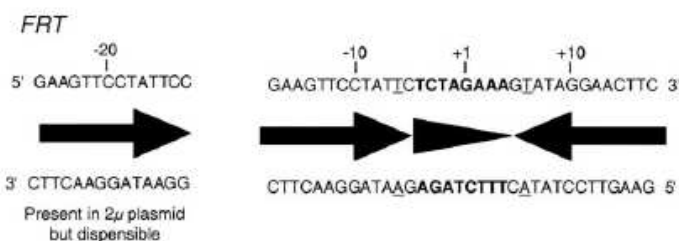
Sequenzspezifische Rekombinasen (SSR) sind Enzyme, die an ihre spezifischen Erkennungssequenzen (*recombination targets* = RTs) binden und eine Neukombination von DNA Molekülen vermitteln können. Das erste sequenzspezifische Rekombinationssystem, das zur Einführung konditional induzierbarer Genmutationen in der Maus eingesetzt wurde, ist das Cre-lox System [17]. Die Rekombinase Cre (*causes recombination of the bacteriophage P1 genome*) wurde im *E. coli* P1 Phagen entdeckt, wo sie für die Zirkularisierung des Phagengenoms während der Infektion benötigt wird [18]. Sie ist ein Mitglied der  $\lambda$ -Integrase Superfamilie und wird zu den Tyrosinrekombinasen gezählt. Das 38 kDa Cre Protein, das aus 343 Aminosäuren besteht, erkennt seine spezifischen so genannten loxP (*locus of cross-over (x) in P1*) Zielsequenzen und induziert aufgrund seiner enzymatischen Aktivität ohne zusätzliche Cofaktoren an loxP flankierten DNA Molekülen ein Rekombinationsereignis [19]. LoxP Erkennungssequenzen sind 34 bp lange DNA Motive und bestehen aus 13 bp langen palindromen Sequenzen (*inverted repeats*), die eine asymmetrische 8 bp Kernregion (*spacer*) flankieren (siehe Abbildung 1.1 A). Die palindromen Elemente werden jeweils von einer Untereinheit der Rekombinase gebunden, während die *spacer* Sequenz die Schnitt-, Austausch- und Ligationsstelle bildet, die zusätzlich der gesamten Sequenz durch ihre Asymmetrie eine Orientierung verleiht [19]. Die Cre vermittelte Rekombination beginnt mit der Bindung der Rekombinase an das DNA Molekül. Zwei Cre Monomere lagern sich an die *inverted repeats* einer loxP Sequenz und bilden zusammen mit zwei weiteren Monomeren, die ihrerseits an die zweite loxP Sequenz gebunden sind, einen synaptischen Rekombinationskomplex (siehe Abbildung 1.1 C). Nucleophile Tyrosinreste zweier Cre Untereinheiten schneiden die DNA. Bevor es zum ersten Strangaustausch kommt,

werden vorübergehend 3'-Phosphotyrosinbrücken gebildet, um eine DNA Hollidaystruktur zu erzeugen. Ihre Entstehung führt zur Aktivierung des zweiten Paares von Rekombinase Monomeren, zu einem Schnitt in den komplementären DNA Strängen und zur Bildung von 3'-Phosphotyrosinbrücken, was anschließend in einem zweiten Strangaustausch resultiert. In der letzten Stufe zerfällt der synaptische Rekombinationskomplex in freie Cre Proteine und Reaktionsprodukte, wodurch die Rekombination fertig gestellt wird [20, 21].

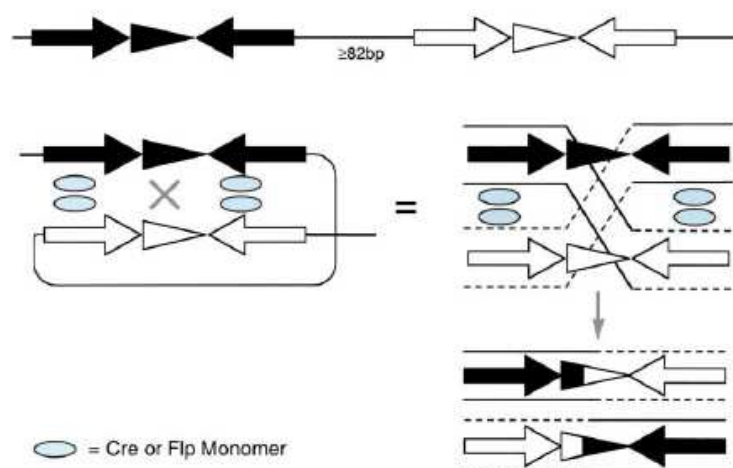
#### A Cre recombinase target site



#### B Flp recombinase target site



#### C Mechanism of Cre or Flp-mediated recombination



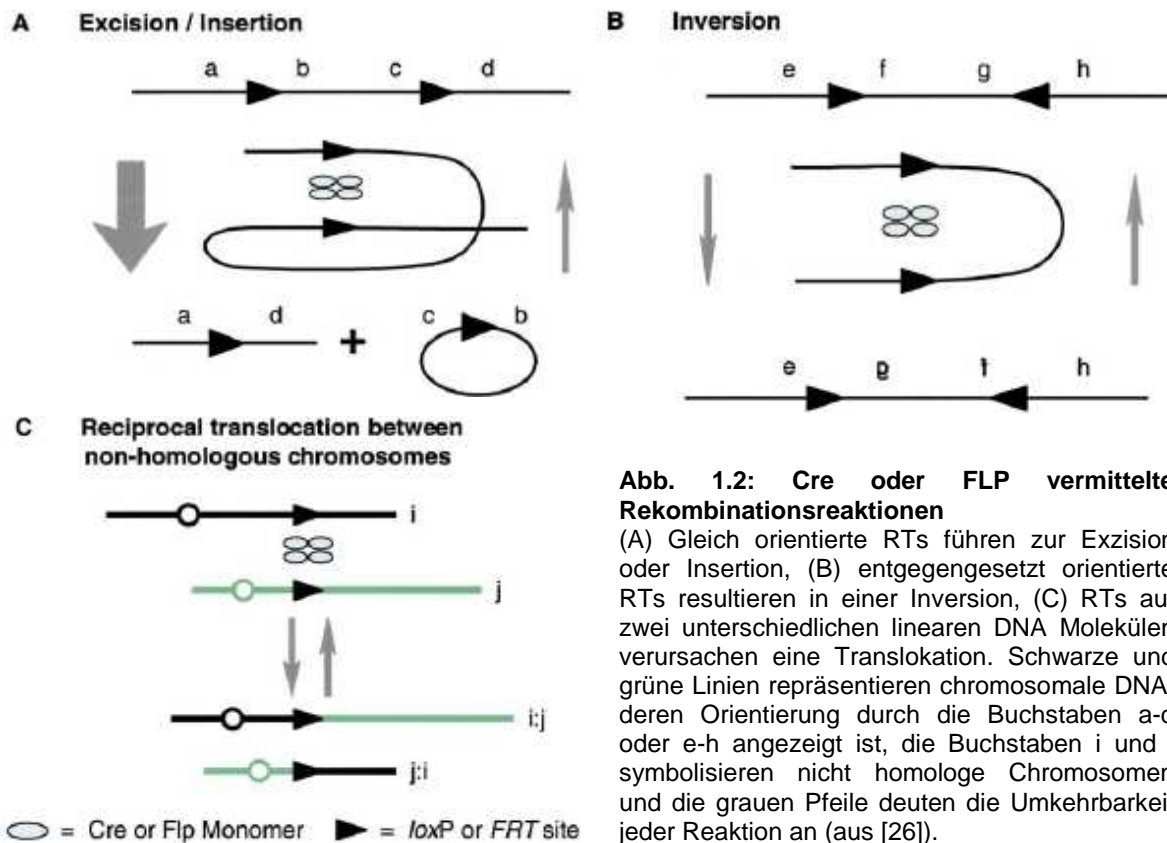
#### Abb. 1.1: Cre und FLP Zielsequenzen sowie der Rekombinationsmechanismus

Die Cre Rekombinase Zielsequenz (A) und die FLP Rekombinase Zielsequenz (B) bestehen aus 13 bp *inverted repeats* (horizontale Pfeile), die eine 8 bp *spacer* Region (Dreiecke) flankieren, die den Sequenzen eine Orientierung verleiht. Die FRT Sequenz enthält einen zusätzlichen *inverted repeat*. (C) Ein durch zwei RTs flankiertes DNA Molekül (oben). Synaptischer Komplex, der aus Rekombinase Molekülen und zwei gleichen RTs gebildet wird (Mitte). Ein Rekombinase Monomer bindet an jedes 13 bp *repeat*, während an der *spacer* Region die Trennung der Stränge, ihr Austausch sowie ihre Ligation stattfindet, angedeutet durch ein x. Die Endprodukte der Reaktion bestehen jeweils zur Hälfte aus der Sequenz der anderen Rekombinase RT (unten) (aus [26]).

Ein weiteres sequenzspezifisches Rekombinationssystem ist das FLP-FRT System. Die FLP Rekombinase (benannt nach ihrer Fähigkeit, ein DNA Fragment umzukehren) wurde im 2-micron Plasmid von *Saccharomyces cerevisiae* entdeckt. Genau wie Cre gehört sie der  $\lambda$ -Integrase Superfamilie an und wird ebenfalls zu den Tyrosinrekombinasen gezählt. FLP ist ein 45 kDa Protein aus 424 Aminosäuren, das 48 bp lange FRT (*FLP Recombination Target*) Motive erkennt und zwischen ihnen eine Rekombination vermittelt [22, 23]. FLP trägt zum Erhalt der Kopienzahl des 2-micron Plasmids in *Saccharomyces cerevisiae* bei [24]. Der Rekombinationsmechanismus ist dem der Cre Rekombinase

ähnlich [25]. Das FRT Motiv unterscheidet sich zwar von dem loxP Motiv in seiner Sequenz, der Aufbau aus palindromen Sequenzen, die eine asymmetrische Kernsequenz flankieren, ist jedoch bei beiden Molekülen gleich, wobei die FLP Zielsequenz einen zusätzlichen *inverted repeat* enthält (siehe Abbildung 1.1 B).

Die Rekombinasen Cre und FLP haben unterschiedliche Auswirkungen auf mit ihren Zielelementen flankierte DNA Moleküle, abhängig von der Orientierung der loxP bzw. FRT Sequenzen und der Anzahl beteiligter DNA Stränge (siehe Abbildung 1.2 A-C).



**Abb. 1.2: Cre oder FLP vermittelte Rekombinationsreaktionen**

(A) Gleich orientierte RTs führen zur Exzision oder Insertion, (B) entgegengesetzt orientierte RTs resultieren in einer Inversion, (C) RTs auf zwei unterschiedlichen linearen DNA Molekülen verursachen eine Translokation. Schwarze und grüne Linien repräsentieren chromosomale DNA, deren Orientierung durch die Buchstaben a-d oder e-h angezeigt ist, die Buchstaben i und j symbolisieren nicht homologe Chromosomen und die grauen Pfeile deuten die Umkehrbarkeit jeder Reaktion an (aus [26]).

Haben die RTs die gleiche Orientierung, erfolgt die Exzision eines loxP bzw. FRT flankierten Segments, das als zirkuläres Reaktionsprodukt aus dem Rekombinationsvorgang hervorgeht, wobei jeweils eine Erkennungssequenz in der ursprünglichen und zirkulären DNA zurückbleibt. Da die Reaktion reversibel ist, kann das zirkuläre Produkt oder ein anderes eine RT Sequenz enthaltendes Plasmidfragment theoretisch in die Exzisionsstelle reintegrieren. Die intramolekulare Exzision wird der intermolekularen Integration jedoch vorgezogen, weil die beiden Erkennungssequenzen nur durch eine begrenzte Distanz voneinander entfernt sein können, um eine Rekombination zu ermöglichen. Die Exzisionsreaktion ist *in vivo* irreversibel, weil das zirkuläre im Gegensatz zum chromosomalen Reaktionsprodukt nicht repliziert und mit jeder Zellteilung verdünnt wird. Diese Reaktion ist die Grundlage der konditionalen Geninaktivierung. Haben die RTs hingegen entgegengesetzte Orientierungen, wird das

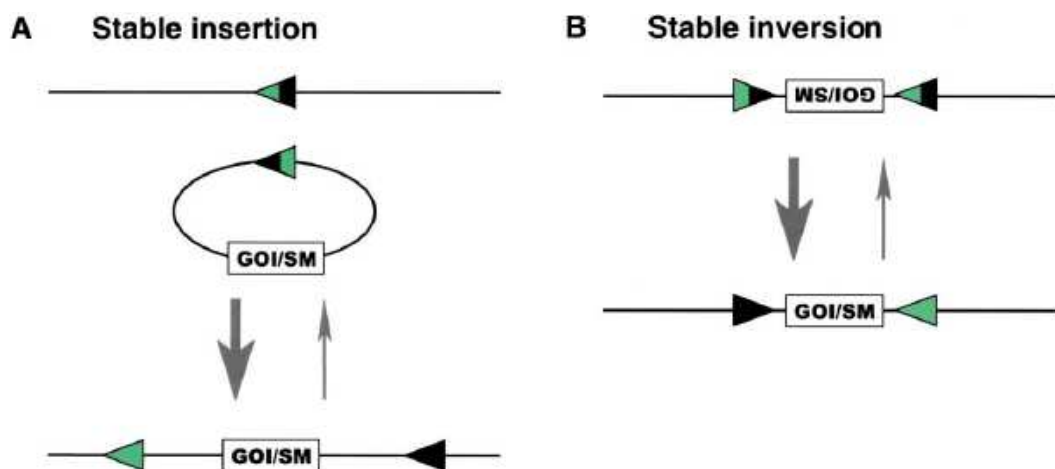
DNA Segment durch den Rekombinationsprozess invertiert. Da diese Reaktion reversibel ist, liegen 50% des Endproduktes zeitweise in einer der beiden möglichen Orientierungen vor, während das DNA Molekül in Anwesenheit der Rekombinase permanent invertiert wird. Rekombinationsprozesse zwischen Zielmotiven auf unterschiedlichen DNA Molekülen führen zum Strangtausch oder zur Translokation [26].

Ein Vergleich der Aktivität beider Rekombinasen miteinander zeigt, dass Cre sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine wesentlich effektivere Rekombination als FLP durchführt [27]. Um Proteinformen mit einer verbesserten enzymatischen Leistung und damit einer höheren Rekombinationseffizienz zu erhalten, wurden die Wildtyp Versionen der Cre und FLP Rekombinasen modifiziert. Ein *mammalian Cre recombinase* Gen wurde synthetisiert [28] und eine *improved Cre* (iCre) entwickelt [29], um der prokaryotischen Sequenz einen eukaryotischen Charakter zu verleihen. Da die Expressionslevel mit den Codon optimierten Formen nur leicht gesteigert werden konnten, wird für die meisten Studien nach wie vor die ursprüngliche Cre Rekombinase verwendet. Das FLP Enzym hat sein Temperaturoptimum bei 30°C und ist bei 37°C recht ineffizient [30]. Aus diesem Grund wurde ein modifiziertes *enhanced FLP* (FLPe) Enzym mit erhöhter Thermostabilität entwickelt [31]. Obwohl mit dieser Variante die Rekombinationseffizienz um etwa das Vierfache gesteigert werden konnte, erreicht FLPe in transienten Transfektionsexperimenten trotzdem nur etwa 25% des Cre Aktivitätslevels [32], während die Rekombinase in FLPe exprimierenden transgenen Mäusen (siehe unten) effektiv ist [33, 34]. Raymond und Soriano haben eine *mouse codon-optimized FLP* (FLPo) Rekombinase vorgestellt, die in stabilen Transfektionsanalysen eine wesentlich höhere DNA Rekombinationseffizienz als die FLPe Rekombinase zeigt [35]. Ob diese Rekombinase tatsächlich so effizient ist, muss in weiteren Analysen untersucht werden.

Obwohl Cre einen prokaryotischen Ursprung hat, ist sie trotzdem in der Lage, in den Nukleus zu gelangen. Es konnte gezeigt werden, dass das Cre Protein eine schwache kryptische Kernlokalisierungssequenz enthält, die einen aktiven Transport in den Zellkern ermöglicht [36]. Unabhängig von dem Vorhandensein dieser Sequenz wurde die Rekombinase zusätzlich mit dem heterologen SV40 (*simian virus 40 large T antigen*) Kernlokalisierungssignal (*nuclear localization signal* = NLS) fusioniert [37], um ihre Translokation zu vereinfachen [38]. Die Fusion eines NLS mit der FLPe Rekombinase hat zu einer dreifachen Erhöhung der Rekombinationseffizienz geführt [39]. Zusätzlich kann der N-Terminus der Cre Rekombinase mit einer Kozak Konsensussequenz versehen werden, um eine effiziente Translationsinitiation in Säugerzellen zu ermöglichen [40].

Auch die Zielsequenzen der Cre und FLP Rekombinasen wurden verändert, um die Möglichkeiten der sequenzspezifischen Rekombination zu erweitern. Ein Rekombinationsprozess kann zwischen mutierten Erkennungssequenzen erfolgen,

solange die Sequenz in den *cross-over* Regionen identisch ist. Infolgedessen lassen sich die möglichen Variationen in der Sequenz in zwei Klassen einteilen. Im ersten Fall wird die Bindungssequenz verändert. Mutationen in den *inverted repeats* führen zur Abnahme der Bindungsaffinität von Rekombinasen an ihre Zielsequenzen, wird aber nur eine Hälfte eines *inverted repeats* verändert, wird die Rekombinationseffizienz nicht beeinträchtigt [41]. Folglich wurden zwei mutante loxP Elemente, lox66 und lox77 [42, 43] und entsprechende FRT Motive, FRT mutant<sup>-10</sup> und FRT mutant<sup>+10</sup> [44] erzeugt (auch als LE bzw. RE Mutanten bezeichnet), die Nukleotidsubstitutionen im rechten bzw. im linken 13 bp *repeat* der Erkennungssequenz enthalten. Wird ein DNA Molekül mit beiden alternativen lox bzw. FRT Motiven flankiert, entsteht nach erfolgter Rekombination, die jedoch an diesen Sequenzen ineffektiver ist als an Wildtyp Sequenzen, eine Wildtyp loxP bzw. FRT Erkennungssequenz, sowie ein zweites Element, das zwei mutante *repeats* enthält. Eine Rückreaktion an den Zielsequenzen findet nicht statt, da die Bindungsaffinität der entsprechenden Rekombinase an eine Doppelmutante sehr gering ist [45]. Diese mutanten Sequenzen wurden für stabile Insertions- und Inversionsstrategien *in vivo* eingesetzt [45, 46], deren Prinzip in Abbildung 1.3 schematisch dargestellt ist.



**Abbildung 1.3: Mutante Cre oder FLP Erkennungssequenzen für stabile Insertionen oder Inversionen**

(A) Stabile Insertionen bzw. (B) stabile Inversionen beruhen auf dem einmaligen Rekombinationsereignis zwischen *left element* (LE) und *right element* (RE) mutanten RTs, wobei eine Wildtyp und eine doppelt mutierte RT entsteht, die nicht miteinander rekombinieren können, so dass eine Rückreaktion nicht stattfinden kann. SM, Selektionsmarker, GOI, *gene-of-interest*; Dreieck: schwarz = Wildtyp loxP oder FRT; schwarz-grün = RE bzw. LE Mutante; grün = Doppelmutante (aus [26]).

Zu der zweiten Klasse von mutanten Zielsequenzen zählen Sequenzen, die Substitutionen in der *cross-over* Region des *spacers* enthalten. Zu solchen *spacer* Mutanten zählt lox511 [47, 48] bzw. die FLP Rekombinase Varianten F3 und F5 [49]. Basierend auf der Beobachtung, dass eine Rekombinationsreaktion nur zwischen homo- aber nicht heterotypen Erkennungssequenzen erfolgt, wurden weitere Insertions- und

Inversionsstrategien, RMCE (*recombinase-mediated cassette exchange*) [50-52] bzw. "FLEx" *switch* (das Zielgen liegt hier "geflex" vor) [53], entwickelt. Da eine schwache Rekombination zwischen den heterotypen Motiven loxP/lox511 festgestellt werden konnte [54], werden doppelt mutierte lox Motive wie lox5171, lox2272 [55] oder m2 für RMCE Experimente bevorzugt [56].

Ein Vorteil des Cre Rekombinationssystems ist, dass es ohne zusätzliche Cofaktoren funktioniert und dass durch den Prozess keine Nukleotide in DNA Moleküle hinzugefügt werden oder verloren gehen. Des Weiteren sind die kurzen Erkennungssequenzen, deren Lokalisierung in chromosomaler DNA die Expression benachbarter Gene nicht beeinflusst und zuletzt die vielfältige Nutzung des Systems von Vorteil, weil das Cre Protein an *supercoiled*, relaxierten und linearen DNA Molekülen mit sogar weit auseinander liegenden flankierenden Zielsequenzen eine Rekombination vermitteln kann [57]. Ein Nachteil der Cre Rekombinase ist, dass sie an kryptischen loxP Sequenzen rekombiniert, die im Hefe und Säugergenom natürlich vorkommen [58, 59]. Darüber hinaus führt eine starke Cre Expression in Säugerzellen zur Inhibition der Proliferation, zu Schäden innerhalb der DNA und zu gehäuft auftretenden Schwesterchromatid Austauschreaktionen, die wahrscheinlich an pseudo-loxP Sequenzen erfolgen [60].

Eine weitere sequenzspezifische Rekombinase, die in *gene targeting* Experimenten eingesetzt wird, ist  $\phi$ C31 (PhiC31). Sie gehört zur Familie der großen Serin Integrasen und wurde aus dem *Streptomyces* Phagen isoliert.  $\phi$ C31 vermittelt eine sequenzspezifische Rekombination zwischen attP und attB Erkennungsstellen (att steht für *attachment sites* für die Integrase im Phagen- oder Bakteriengenom) ohne Cofaktoren, wobei nach erfolgter Rekombination zwei unterschiedliche Motive entstehen, nämlich attL und attR, die keine Substrate für die Integrase darstellen, so dass die keine Rückreaktion erfolgen kann [61]. Die heterotypen 39 bp attP und 34 bp attB Sequenzen enthalten unvollständige palindrome Sequenzen (*inverted repeats*) und flankieren eine asymmetrische Kernsequenz aus drei Nukleotiden, die den Zielsequenzen eine Orientierung verleiht [62]. Die  $\phi$ C31 Integrase vermittelt Deletionen und Inversionen von attP/attB flankierten DNA Molekülen und wird für Integrationsstrategien eingesetzt [63-65]. Weil das  $\phi$ C31 Protein aufgrund seines hohen Molekulargewichts nicht passiv in den Nukleus diffundieren kann, wurde es mit einem NLS am C-Terminus fusioniert, um die Migration in den Zellkern zu erleichtern. Das resultierende  $\phi$ C31-NLS Fusionsprotein zeigte eine Rekombinationsaktivität, die mit der des Cre Enzyms vergleichbar und um ein Vielfaches höher als die der NLS-FLPe Rekombinase war [32]. Parallel zur FLPo Rekombinase haben Raymond und Soriano eine *mouse codon-optimized*  $\phi$ C31 Variante ( $\phi$ C31o) entwickelt, deren Aktivität ebenfalls vergleichbar mit der des Cre Proteins ist [35]. Ein Nachteil des  $\phi$ C31 Systems ist, dass im Säugergenom endogene pseudo-attP



Sequenzen existieren und somit Strategien, die auf der Verwendung von attB Motiven beruhen, zu unerwünschten Integrationen und unerwarteten Ergebnissen führen können [64]. Diese Sequenzen können aber auch gezielt für Integrationsstrategien genutzt werden [66].

Das entscheidende Merkmal der vorgestellten Systeme für den Einsatz in konditionalen *gene targeting* Experimenten ist, dass sie in Säugetierzellen funktionieren.

### 1.5.2 Konditionale *gene targeting* Strategien

Sowohl die Cre als auch die FLP Rekombinase wurden in der Vergangenheit bereits erfolgreich für Untersuchungen von Genfunktionen in Organismen wie der Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*) [67], dem Zebrafisch (*Danio rerio*) [68], dem Frosch (*Xenopus laevis*) [69] und verschiedenen Pflanzenarten (u. a. *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana tabacum*), wo sie zur Entfernung von Selektionskassetten aus inserierten Transgenen dienen [70], eingesetzt. Die Funktionalität der Cre Rekombinase wurde *in vitro* in verschiedenen Säugerzellen [71, 72] und *in vivo* in doppelt transgenen Mäusen, die ein Cre und ein loxP flankiertes Transgen tragen, nachgewiesen [73], wodurch gezeigt wurde, dass sie als Werkzeug zur Genommanipulation verwendet werden kann.

Konditionale *gene targeting* Experimente bestehen aus zwei Elementen: dem loxP oder FRT flankierten Genabschnitt (ein solches Allel wird dann als "floxed" bzw. "flrted" bezeichnet), das inaktiviert werden soll und der Art und Weise, durch die eine gewebe- und/oder zeitspezifische Kontrolle erreicht werden kann.

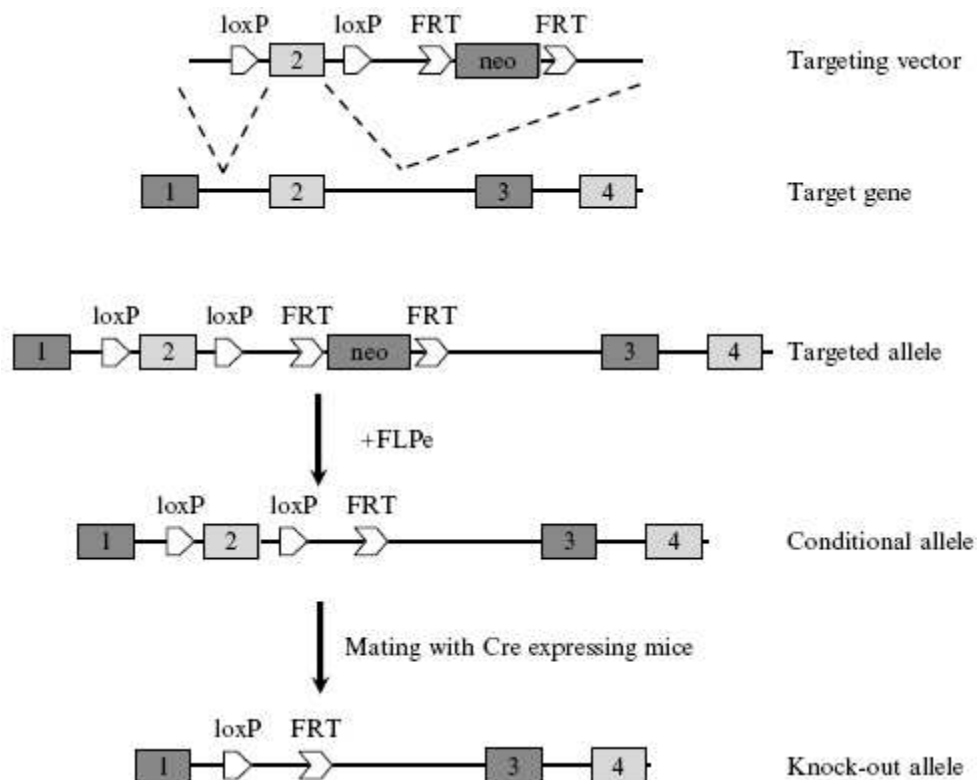
Das Gelingen von Experimenten hängt zum großen Teil von der Wahl der geeigneten Position für die Insertion der RTs im zu inaktivierenden Gen ab. Im Idealfall würde das gesamte Gen von Erkennungssequenzen flankiert werden, um eine vollständige Inaktivierung zu gewährleisten. In der Praxis ist das nur bei aus einem Exon bestehenden oder sehr kurzen Genen durchführbar, da die Entfernung zwischen loxP bzw. FRT Elementen ein Faktor ist, der die Rekombinationseffizienz beeinflusst [74]. Alternativ werden ausgewählte Exons des interessierenden Gens mittels homologer Rekombination mit loxP bzw. FRT Motiven flankiert, um konditionale Nullmutationen zu erzeugen. Introns werden dabei als Insertionsstelle bevorzugt, da die Funktionalität des Gens zunächst nicht eingeschränkt wird, solange keine für das Spleißen notwendigen Sequenzen beschädigt werden. Nach Rekombinase vermittelter Deletion des flankierten Bereichs wird der Leserahmen des Gens verschoben, wodurch im neu gebildeten Leseraster Stopcodons entstehen, die in einem verkürzten Transkript oder wenn sie als prämatüre Stopcodons in der Sequenz erkannt werden, in dessen Degradierung durch *nonsense mediated mRNA decay* (NMD) (siehe unten) und somit in einem inaktiven Protein resultieren. Auch das alternative Spleißen von Genen und die Auswahl von zu deletierenden Exons, die aus

einem Vielfachen von drei Nukleotiden bestehen, muss berücksichtigt werden, damit es nicht zu Misserfolgen kommt. Eine Deletion solcher Exons führt nicht zu einer Verschiebung des Leserasters, so dass zwar verkürzte aber überwiegend weiterhin aktive und funktionelle Proteine gebildet werden können. Um Gene mittels Deletion eines Exons erfolgreich zu inaktivieren, ist es notwendig, die Struktur und vor allem die Intronphasen des entsprechenden Gens genau zu kennen, weil für gewöhnlich nur dann eine Inaktivierung erfolgt, wenn das Leseraster der nicht betroffenen Exons wenigstens teilweise verschoben wird. Es wäre daher von Vorteil, wenn ein System zur Verfügung stehen würde, dass unabhängig von der Intronphase des interessierenden Gens dessen konditionale Inaktivierung ermöglicht.

Die Grundstrategie für die Herstellung von konditionalen Allelen wurde im Labor von Klaus Rajewsky entwickelt [75]. Mit Hilfe der so genannten tri-lox Methode werden drei loxP Erkennungssequenzen so platziert, dass sowohl die zur Anreicherung rekombinanter ES-Zellen dienende positive Selektionskassette als auch der Genbereich, der deletiert werden soll, flankiert vorliegen. Diese Strategie hat jedoch den Nachteil, dass es schwierig ist, partiell deletierte Allele zu erhalten, in denen das Gensegment weiterhin gefloxt vorliegt, während die Selektionskassette entfernt werden konnte, weil die Cre Expression zu drei möglichen Exzisionsreaktionen führen kann: Deletion des Selektionmarkers, Deletion der gefloxt Genregion oder Deletion des gesamten Abschnitts zwischen dem ersten und dem dritten loxP Element. Ein partielles Cre vermitteltes Rekombinationsereignis wird in ES-Zellen durch transient eingeführte Cre Expressionsplasmide hervorgerufen. *In vivo* dagegen wird eine partielle Deletion mittels einer *balancer* Cre Maus erzielt, die eine schwache Cre Aktivität in befruchteten Oozyten aufweist [76], so dass Rekombination zwischen zwei der drei loxP Stellen mit angemessener Häufigkeit auftritt. Variationen dieser Versuchsdurchführung werden in einer Veröffentlichung von Torres und Kühn vorgestellt [77].

Eine alternative Methode nutzt sowohl das Cre-loxP als auch das FLP-FRT Rekombinationssystem für die Generierung konditionaler Allele. Dabei wird in einem *targeting* Vektor eine spezifische DNA Region des Zielgens gefloxt, während das Selektionsgen von FRT Sequenzen flankiert wird (siehe Abbildung 1.4). Nach der Selektion für HR in ES-Zellen kann der Resistenzmarker durch FLPe vermittelte Rekombination deletiert werden [34, 39], so dass ein konditionales Allel entsteht. Positive Selektionskassetten können entweder *in vitro* oder *in vivo* entfernt werden. Ihre Deletion direkt in ES-Zellen hat den Vorteil, dass das zweite Allel später mit dem gleichen Zielvektor modifiziert werden kann, um ES-Zellen zu erzeugen, die homozygot für die gewünschte Veränderung sind. Homozygote Mäuse werden zur Deletion des loxP flankierter Anteils, wodurch das konditionale Allel inaktiviert und ein *knock-out* generiert

wird, mit Mäusen verpaart, die die effizientere Cre Rekombinase ubiquitär, zelltyp- oder zeitspezifisch exprimieren (siehe unten).



**Abb. 1.4: Strategie zur Generierung konditionaler Allele in der Maus**

Im *targeting* Vektor wird das Exon 2 des Zielgens mit loxP Sequenzen flankiert. Der *targeting* Vektor enthält eine positive Selektionskassette (*neo*), die von FRT Zielsequenzen flankiert wird. Nach der Elektroporation des Vektors in ES-Zellen und der Selektion für Rekombinanten wird das *neo* Gen entweder in ES-Zellen, in der Maus oder in Oozyten mittels FLPe vermittelter Rekombination ausgeschnitten. Homozygote Mäuse für das konditionale Allel werden dann mit Mäusen verpaart, die Cre ubiquitär, gewebe- oder zeitspezifisch exprimiert, wodurch das loxP flankierte Exon 2 aus dem Zielgen deletiert und ein *knock-out* Allel erzeugt wird (aus [41]).

Die Rekombinationsrate zwischen zwei Rekombinase Zielsequenzen im Genom hängt von mehreren Faktoren wie z.B. der Menge aktiver Rekombinase ab. Je höher die Enzymkonzentration, desto schneller erfolgt die Rekombination [78]. Auch die Entfernung zwischen zwei Erkennungssequenzen spielt dabei eine Rolle. Es konnte beobachtet werden, dass die effizienteste Rekombination bei einer Entfernung von 400 bp stattfindet [74]. *In vivo* werden loxP flankierte DNA Moleküle mit einer Länge von bis zu 4Mb effizient durch Cre herausgeschnitten. Die FLP vermittelte Rekombination erfolgt an FRT Sequenzen, die 74bp bis 15kb entfernt sind [74, 79]. Die thermostabile FLPe Rekombinase ist sogar in der Lage, an bis zu 150 kb entfernten Erkennungsstellen zu rekombinieren [26]. Die Position der Zielsequenzen innerhalb des Chromosoms hat ebenfalls einen Einfluss auf die Rekombination, allerdings ist unklar, wie die Chromatinstruktur auf die Rekombinationseffizienz wirkt [80].

### 1.5.3 Systeme zur Expression sequenzspezifischer Rekombinasen

Die Methoden, die eingesetzt werden, um Rekombinasen zu exprimieren, sind vielfältig. In ES-Zellen erfolgt eine Rekombinase Expression nach transienter oder stabiler Transfektion der Zellen mit Rekombinase exprimierenden Plasmiden, was zu einer Rekombinationseffizienz von bis zu 70% führt [57]. Die Cre Rekombinase wird auch in Form eines zellpermeablen Enzyms zur Rekombination *in vitro* genutzt. Dabei wird das Protein mit den mutierten ES-Zellen inkubiert, so dass keine Transfektion mehr erforderlich ist [78, 81].

Für gewöhnlich erfolgt *in vitro* die Deletion der FRT flankierten Selektionskassette durch einen FLPe Expressionsvektor. Im Gegensatz dazu wird *in vivo* meistens das loxP flankierte konditionale Allel deletiert. Dabei werden homozygote Mäuse mit Cre Rekombinase exprimierenden Mäusen verpaart, um Mutationen zu induzieren. Die einfachste Möglichkeit, eine Exzision des konditionalen Allels im gesamten sich entwickelnden Embryo zu erreichen, ist, die mutierte Maus mit einer transgenen Maus zu verpaaren, bei der das Cre oder FLP Gen gezielt in einen endogenen Locus unter die Kontrolle eines ubiquitär aktiven Promoters inseriert worden ist (*knock-in*). Die so genannten Cre oder FLP *deleter* Mauslinien exprimieren die Rekombinase bereits sehr früh in der Entwicklung in allen Zellen [82, 83].

Eine auf spezifische Gewebe oder Zelltypen begrenzte Aktivität der Rekombinase wird mit transgenen Mauslinien erzielt, die die Rekombinase unter der Kontrolle eines gewebespezifischen Promoters exprimieren. Die Inaktivierung des konditionalen Allels erfolgt in doppelt transgenen Nachkommen nur in Geweben oder Zellen, die eine Rekombinase exprimieren, während das konditionale Allel in allen anderen Geweben weiterhin funktionsfähig bleibt, so dass eine gewebe- oder zelltypspezifische Funktion des mutierten Gens untersucht werden kann [84, 85]. Das Expressionsmuster der Rekombinase in Cre oder FLP transgenen Mauslinien kann durch Verpaarungen mit verschiedenen Reporter Mausstämmen charakterisiert werden, bei denen zunächst ein inaktives in einen endogenen Locus inseriertes Reportergen (z.B. *lacZ* oder GFP) (*knock-in*) mittels Cre vermittelter Deletion aktiviert werden kann [86-88]. Transgene Mauslinien, die ein Fusionsprotein aus GFP und Cre gewebespezifisch exprimieren, erlauben eine direkte Untersuchung des Expressionsmusters der Fusionsrekombinase [89]. Der Nachteil bei solchen Mauslinien ist jedoch, dass die Insertion der für das Transgen kodierenden DNA Sequenz üblicherweise in das Initiationscodon eines endogenen Gens erfolgt, wodurch das Zielgen inaktiviert wird. Durch die Verwendung von IRES (*internal ribosome entry site*) Sequenzen in Konstrukten zur Generierung von Mauslinien, die eine Rekombinase oder eine Fusion aus einer Rekombinase und einem Reporter exprimieren, kann eine Expression sowohl des endogenen Gens als auch des Transgens erzielt

werden [90, 91]. Es konnte allerdings beobachtet werden, dass das IRES abhängige zweite Gen wesentlich schwächer exprimiert wird als das erste Gen [92]. Im Fall von Cre transgenen Mäusen könnte das dazu führen, dass die Expressionsmenge der Rekombinase nicht ausreicht, um eine effiziente Rekombination zu vermitteln. De Felipe hat ein System vorgestellt, das eine Co-Expression mehrerer Proteine in äquimolekularen Mengen von einem Vektor ermöglicht [93]. Die so genannte "CHYSEL" (*cis-acting hydrolase element*) Technologie beruht auf einem kleinen aus achtzehn Aminosäuren bestehenden 2A Peptid aus dem Maul- und Klauenseuche Virus (FMDV = *foot-and-mouth disease virus*), das zur unabhängigen Expression von zwei Genen als Linker zwischen die kodierenden Sequenzen eingeführt wird. Solche 2A Sequenzen könnten zur Herstellung von *knock-in* Konstrukten verwendet werden, um eine Co-Expression des Zielgens und des Transgens in äquimolekularen Mengen zu erzielen.

Um den Zeitpunkt zu dem eine Mutation in der Maus ausgelöst werden soll bestimmen zu können, werden induzierbare Rekombinase Systeme eingesetzt (siehe unten). Dabei kann die induzierbare Cre oder FLP Rekombinase ubiquitär oder gewebespezifisch im transgenen Stamm exprimiert werden [94, 95]. Die Inaktivierung des Zielgens erfolgt in doppelt transgenen Tieren dann entweder in allen Zellen oder nur in spezifischen Geweben, aber erst nach Induktion der Rekombinase. So können die Zellen identifiziert werden, die das Zielgen zum Induktionszeitpunkt benötigen.

Die Durchführung von gewebespezifischen Rekombinase vermittelten Geninaktivierungen hängt jedoch von der Verfügbarkeit regulatorischer Elemente ab, die eine Cre oder FLP Expression gezielt einleiten können. Eine Datenbank, die eine Liste mit Cre transgenen Mauslinien (Cre-X-Mice) enthält und ständig aktualisiert wird, wurde von Andras Nagy unter <http://www.mshri.on.ca/nagy/> veröffentlicht [57]. Derzeit wird aufgrund der stetig steigenden Anzahl an transgenen Cre Mauslinien die Datenbank erneuert.

## 1.6 Induzierbare Rekombinase Systeme

Ein Schlüsselpunkt der konditionalen Mutagenese ist, dass der Zeitpunkt, zu dem eine Rekombinationsreaktion erfolgen soll, bestimmt werden kann. Durch die temporale Regulation der Rekombinase Aktivität können zusätzlich zur Erzeugung gewebespezifischer Mutationen Physiologie- und Verhaltensstudien an demselben Tier vor und nach der Generierung eines *knock-out* Allels durchgeführt werden. Dies verhindert Variationen zwischen einzelnen Organismen und limitiert die Zeit für kompensatorische Mechanismen [96]. Dazu wurden zwei alternative Strategien entwickelt, die eine Regulation der Rekombinase Expression auf transkriptioneller oder posttranslationeller Ebene ermöglichen.

### 1.6.1 Transkriptionelle Kontrolle der Rekombinase Aktivität

Eine Strategie zur temporalen Kontrolle der Rekombinase Aktivität beruht auf der Regulation ihrer Transkription durch den Einsatz eines induzierbaren Promotors. Die erste induzierbare Mauslinie wurde erzeugt, indem der Interferon  $\alpha/\beta$  (IFN) abhängige Promotor des *Mx1* Gens zur Regulation der Cre Expression *in vivo* eingesetzt wurde, um das gefloخته DNA Polymerase  $\beta$  (*pol*  $\beta$ ) Gen zu verschiedenen Entwicklungsstadien zu inaktivieren [97]. Das *Mx1* Gen ist eigentlich in der Abwehr viraler Infektionen beteiligt. Der *Mx1* Promotor kann in transgenen Mäusen durch Injektion von Interferon- $\alpha$ , Interferon- $\beta$  oder doppelsträngigen RNAs (Polyinosin-polycytidyl Säure) aktiviert werden, was die Rekombinase Expression zeitlich kontrollierbar macht. Der Einsatz des MxCre Stamms ist auf die Regulation der Genexpression in der Leber und in Zelltypen des Immunsystems beschränkt, wo die Rekombinationseffizienz hoch ist, in anderen Geweben dagegen fällt sie vergleichsweise schwach aus [98]. Weil eine Vielzahl von Zelltypen keine oder nur unzureichende Mengen an IFN Rezeptoren bilden, führt die IFN induzierte Cre Expression zu unvollständiger Inaktivierung von konditionalen Genen in solchen Geweben. Das auf IFN basierende System hat den Nachteil, dass es aufgrund der verwendeten Induktoren endogene Stoffwechselreaktionen beeinflusst, da Interferon als körpereigenes Gewebehormon in menschlichen und tierischen Leukozyten, Fibroblasten und T-Lymphozyten gebildet wird. Außerdem wurde eine Cre Expression in Abwesenheit des Induktors beobachtet, wobei dieser Effekt auch auf den endogenen IFN Level zurückzuführen ist [99], der durch Immunreaktionen des Tieres erhöht sein kann. Eine hygienische Haltung der Tiere ist somit zwingend notwendig, um das Auslösen von Immunreaktionen zu vermeiden.

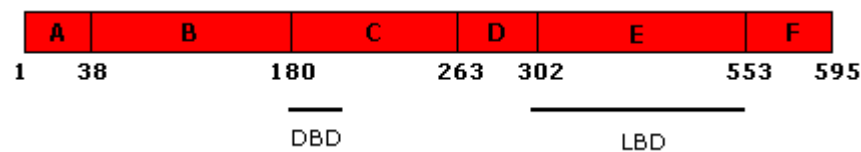
### 1.6.2 Posttranslationelle Kontrolle der Rekombinase Aktivität

Die populärste Methode zur temporalen Regulation der Rekombination basiert auf der Expression einer Rekombinase, die mit einer Liganden bindenden Domäne (LBD = *ligand binding domain*) eines Steroidrezeptors fusioniert ist [100]. Bei der Strategie wird die Cre oder FLP Aktivität posttranslationel nach erfolgter Synthese des Enzyms reguliert.

#### 1.6.2.1 Fusionen von Rekombinasen mit Liganden bindenden Domänen

In eine Vielzahl von Studien konnte gezeigt werden, wie die Aktivität von verschiedenen Proteinen (z.B. Onkoproteine, Transkriptionsfaktoren, RNA Bindungsproteine, Kinasen) Liganden abhängig kontrolliert werden kann, wenn das entsprechende Protein mit der LBD eines Steroidhormonrezeptors fusioniert wird [101].

Steroidhormonrezeptoren dienen nicht nur als Rezeptoren für ihre Hormone (z.B. Östrogen, Progesteron, Glucocorticoid usw.), sondern auch zur Aktivierung der Transkription einiger Zielgene. Die Rezeptoren sind für gewöhnlich aus sechs Domänen (A-F) aufgebaut. Die relevanten Domänen für die Funktion eines Rezeptors sind die DNA bindende Domäne C (DBD), die Liganden bindende Domäne E (LBD) und Domäne D, die eine Verbindung zwischen den Domänen C und E darstellt [102]. Bei A, B und F handelt es sich um transaktivierende Domänen. In Abbildung 1.5 ist schematisch der Aufbau des humanen Östrogenrezeptors dargestellt.



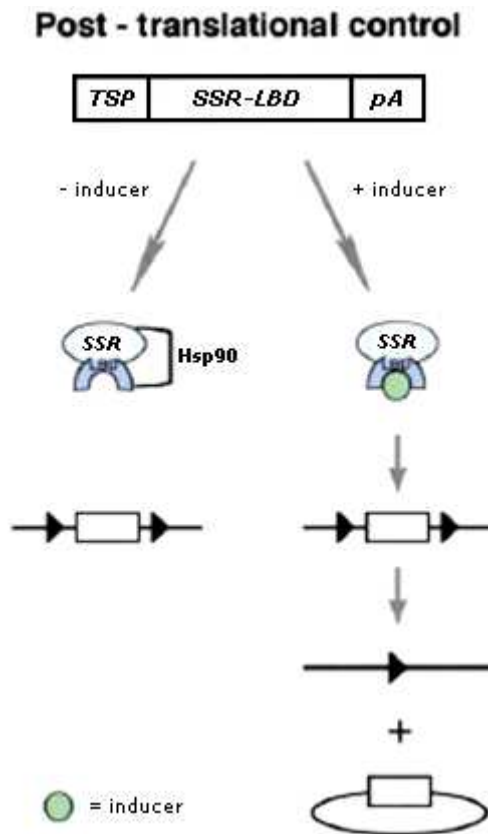
**Abb. 1.5: Schematische Darstellung des humanen Östrogenrezeptors (ER)**

Die Regionen A bis F repräsentieren verschiedene Domänen des ER, die unterschiedliche Funktionen haben. A, B, F = transaktivierende Domänen; C = DNA bindende Domäne (DBD); D = Verbindung zwischen C und E; E = Liganden bindende Domäne (LBD). Die Zahlen deuten die Aminosäuren vom N- bis zum C-Terminus des ER an.

Die Liganden bindenden Domänen fast aller Rezeptoren sind strukturell ähnlich aufgebaut. Sie bestehen aus 12  $\alpha$ -Helices (H1-12), die antiparallel liegen. In Abwesenheit ihres Liganden liegen die Rezeptoren als Aporezeptorkomplexe vor. Dabei werden sie von 90 kDa Hitzeschockproteinen (Hsp90) gebunden und im Zytoplasma festgehalten. In diesem Komplex sind die Rezeptoren inaktiv und können ihre transaktivierenden Eigenschaften nicht ausüben [100, 103]. Durch die Bindung eines Liganden an seinen Rezeptor wird eine Konformationsänderung der LBD ausgelöst, die zur Umlagerung der Helices H3, H10, H11 und H12 und als Folge zur Ablösung des Hsp90 führt, woraufhin der Rezeptor aufgrund von zwei Kernlokalisierungssignalen (NLS) in den Zellkern transloziert wird [102, 104]. Im Nukleus bindet er als Homodimer an seine spezifischen Erkennungssequenzen und aktiviert die Transkription der Zielgene [105, 106].

Eine posttranslationelle Kontrolle der Rekombinase Aktivität erfolgt durch ihre Fusion mit einer regulatorischen LBD eines Hormonrezeptors [107]. Mittels eines solchen Fusionsproteins ist es durch die Verabreichung des entsprechenden natürlichen Steroidhormons oder eines synthetischen Hormonanalogs möglich, den Startpunkt des Rekombinationsprozesses genau festzulegen. Die Fusionsrekombinase liegt in Abwesenheit eines geeigneten Liganden an Hitzeschockproteine gebunden vor und ist inaktiv, reagiert aber sehr schnell auf die Verabreichung eines Induktors [103, 108]. Durch eine Liganden induzierte Konformationsänderung wird das Fusionsenzym aus dem Komplex entlassen und gleichzeitig aktiviert, was eine Translokation in den Zellkern erlaubt, um an einem mit Rekombinase Zielsequenzen flankiertem Zielgen zu

rekombinieren [109]. Dieser Regulationsmechanismus ist schematisch in Abbildung 1.6 veranschaulicht. Zusätzlich zur zeitlichen Kontrolle in allen Geweben oder Zelltypen kann die Rekombinase Expression mittels gewebe- oder zelltypspezifischer Promotoren beschränkt werden. Auf diese Weise sind zwei Regulationsebenen, die räumliche und zeitliche, in einem einzigen Transgen kombinierbar [108].



**Abb. 1.6: Posttranslationelle Kontrolle der Rekombinase Aktivität**

Ein gewebespezifisches SSR-LBD Fusionsprotein ist in Abwesenheit eines Liganden (- *inducer*) an Hsp90 Komplexe gebunden und inaktiv (links). Bindung eines Liganden (+ *inducer*) führt zur Auflösung der Interaktion und Freisetzung der SSR-LBD, die dann in den Nukleus transloziert wird, wo die SSR eine Deletion eines mit RTs (schwarze Dreiecke) flankierten DNA Moleküls (Rechteck) vermittelt (rechts). TSP, gewebespezifischer Promotor; SSR, sequenzspezifische Rekombinase; LBD, Liganden bindende Domäne; pA, Polyadenylierungssignal; Hsp90, Hitzeschockprotein; inducer, synthetischer Ligand (verändert aus [30]).

Dieses System wurde bereits für Fusionen von Cre oder FLPe Rekombinase mit Liganden bindenden Domänen des humanen und murinen Östrogenrezeptors (ER bzw. Mer) [100, 107], des Progesteronrezeptors (PR) [110], des Androgenrezeptors sowie des Glucocorticoidrezeptors [108] eingesetzt.

#### 1.6.2.1.1 Fusionen von Rekombinasen mit Liganden bindenden Domänen von Östrogenrezeptoren

Für die ersten Experimenten, um eine posttranslationelle Kontrolle der Rekombinase Aktivität *in vitro* zu ermöglichen, wurde die LBD des humanen Östrogenrezeptors (ER) mit Cre fusioniert [107]. Weil jedoch die chimäre Rekombinase (Cre-ER) durch das endogene im Plasma vorkommende Steroidhormon 17 $\beta$ -Östradiol (E2) aktiviert werden kann, war ihre Anwendung für Mausexperimente eingeschränkt [111]. Folglich wurden Mutationen in die LBD eingebracht, die ausschließlich eine Aktivierung mittels synthetischer Liganden erlauben. Der Einsatz mutanter ER Liganden bindender Domänen, die nur durch



synthetische Antagonisten stimuliert werden können, ist notwendig, um eine strenge Kontrolle zu erreichen, da eine durch endogene Liganden ausgelöste Aktivität zu einer unerwünschten Hintergrundrekombination der Fusionsrekombinase führen kann. Das System aus SSR und mutierter LBD wurde entwickelt, um das Signal-zu-Rausch Verhältnis (Liganden induzierte Rekombination zu Hintergrundrekombination) zu verbessern [101].

In den vergangenen fünfzehn Jahren wurden sowohl humane als auch murine Östrogenrezeptoren mutiert und auf ihre Sensitivität gegenüber dem endogenen Steroid 17 $\beta$ -Östradiol und seinen synthetischen Antagonisten Tamoxifen (Tam) und 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT) untersucht. Danielian und Kollegen generierten die erste mutante LBD eines murinen Östrogenrezeptors (Mer) mittels Substitution der Aminosäure Glycin an Position 525 durch ein Arginin (G525R). Diese Mutation führte zum Verlust der Bindungsaffinität zu 17 $\beta$ -Östradiol jedoch nicht zu den Antiöstrogenen Tam oder 4-OHT. Die Bindungsaffinität zu 4-OHT wurde dabei mit zehn- bis hundertfach höher angegeben als zu Tam [112]. Die MerG525R LBD wurde zur Herstellung einer Cre-Mer Fusionsrekombinase verwendet und von Zhang und Kollegen bei einer modifizierten Rekombinaseform eingesetzt, wo sie am N- und C-Terminus mit Cre (MerCreMer) fusioniert worden ist. Die Autoren zeigten, dass die Kontrolle des Rekombinationsprozesses mit zwei Mer Domänen an beiden Enden des Fusionsproteins strenger war als mit einer C-terminalen allein [100]. Feil und Kollegen erzeugten eine mutierte LBD des humanen Östrogenrezeptors (ER). Sie nutzten die als ERT bezeichnete LBD mit einer G521R Mutation zur Herstellung einer transgenen Cre-ERT Mauslinie, die das Fusionsprotein nach 4-OHT Induktion ubiquitär, außer im Thymus, exprimiert [113]. In einer weiteren Cre-ERT Maus wurde durch den Einsatz des *enhancer* für die schweren Ketten der Immunglobuline (E $\mu$ ) eine zelltypspezifische Hormon abhängige Rekombination erzielt, die sich nur auf B-Zellen beschränkte [113]. Vasioukhin und Kollegen stellten die Expression dieser induzierbaren Cre Rekombinase unter die Kontrolle des humanen Keratin 14 Promotors und demonstrierten *in vivo*, dass die Expression so zelltypspezifisch induzierbar nur in basalen Keratinocyten der murinen Haut erfolgt [114]. Die größte Einschränkung beim Einsatz von Tamoxifen *in vivo* ist seine toxische Wirkung. Um dieses Problem zu beheben, wurden weitere induzierbare Fusionsrekombinasen entwickelt, die niedrigere Tam bzw. 4-OHT Konzentrationen zur Aktivierung benötigen als das ursprüngliche Cre-ERT Protein. Feil und Kollegen gelang die Charakterisierung von zwei 4-OHT sensitiven Hormon abhängigen LBD Varianten des ER. Die erste so genannte ERT1 Form enthält die G400V/L539A/L540A Dreifachmutation in der LBD und die zweite ERT2 Form die G400V/M543A/L544A Dreifachmutation. Fusionsproteine aus Cre mit ERT1 bzw. ERT2 konnten effizient durch den synthetischen

Antagonisten 4-OHT induziert werden und waren nicht sensitiv für endogenes 17 $\beta$ -Östradiol [111]. Die Cre-ERT2 Variante war dabei annähernd zehnmal sensitiver für den Liganden *in vivo* als die ursprüngliche Cre-ERT Form. Das Cre-ERT2 Fusionsprotein zeigte auch die effizienteste Rekombinationsaktivität nach der Translokation in den Zellkern [115]. Um eine noch strengere Kontrolle der Rekombination zu ermöglichen, wurde die ERT2 Domäne wie bereits auch schon die Mer Form mit beiden Enden der iCre Sequenz fusioniert, was zu einer Steigerung der Rekombinationseffizienz und Verminderung der Hintergrundaktivität führte [116]. Die ERT2 LBD wurde für die Herstellung einer Vielzahl induzierbarer Cre Mauslinien verwendet, die das Fusionsprotein gewebe- und zeitspezifisch exprimieren sowie zur Generierung einer induzierbaren *deleter* Maus [117-119].

Eine entscheidende Anforderung an induzierbare *targeting* Experimente ist, dass der Rekombinationsprozess räumlich und/oder zeitlich beschränkt werden kann und dass eine spezifische Expression des Transgens erfolgt. Die Aktivität der Rekombinase sollte deshalb strikt von der Anwesenheit des exogenen Liganden abhängig sein [109]. Obwohl die *in vitro* Aktivität des Cre-ERT2 Fusionsproteins in Anwesenheit des synthetischen Liganden vergleichbar mit der des Wildtyp Enzyms ist, konnte in Abwesenheit des Induktors eine schwache Hintergrundaktivität beobachtet werden. Ungeachtet dieser Tatsache war *in vivo* keine Rekombination ohne vorherige Induktion mit 4-OHT detektierbar [115, 116]. Um jedoch unerwartete Hintergrundaktivitäten wie sie zuletzt durch Kreuzkontaminationen mit Tamoxifen in Maushäusern aufgetreten sind zu vermeiden, müssen auch externe Faktoren streng kontrolliert werden [120].

Im Gegensatz zu den vielen verschiedenen Fusionen aus Cre mit mutierten ER Liganden bindenden Domänen wurden bislang nur wenige Rekombinase Varianten beschrieben, die aus Fusionen von FLP bzw. FLPe mit einer mutierten ER LBD bestehen [121, 122], was auf die grundsätzlich schwächere Rekombinationseffizienz der FLP bzw. FLPe Form zurückzuführen sein dürfte.

Aufgrund der effektivsten Induktion und nachfolgenden Rekombination sowie der schwachen Hintergrundaktivität ist die Cre-ERT2 Variante für die Erzeugung räumlich und/oder zeitlich kontrollierter somatischer Geninaktivierungen nach wie vor das bevorzugte System.

#### **1.6.2.1.2 Fusionen von Rekombinasen mit Liganden bindenden Domänen von Progesteronrezeptoren**

Eine weitere Hormon bindende Domäne, die erfolgreich für die Produktion chimärer induzierbarer Cre Proteine genutzt wird, ist die LBD des Progesteronrezeptors (PR). Eine C-terminal mutierte PR Form (hPR891), die den Antagonisten Mifepriston (Mfp = RU486)

aber nicht Progesteron [123] bindet, wurde mit NLS-Cre fusioniert, was zu einem streng kontrollierbaren Induktionsvermögen des Fusionsproteins führte [110]. Dieses als Cre-PR1 bezeichnete Fusionsenzym verhält sich ähnlich gut wie das Cre-ER Fusionsprotein und wurde auch *in vivo* erfolgreich eingesetzt [124, 125]. Im Labor von Klaus Rajewsky wurde ein Cre\*PR Fusionsprotein konstruiert, mit dem eine schwächere Hintergrundaktivität und erhöhte Sensitivität für den synthetischen Liganden RU486 erzielt werden konnte [126]. Indem die Fusionsrekombinase unter die Kontrolle eines gewebespezifischen Promotors gestellt wurde, konnte gezeigt werden, dass das Fusionsprotein räumlich und zeitlich induzierbar ist [99]. Das häufigste Problem im Zusammenhang mit dem Progesteronrezeptor System ist, dass RU486 zur Unfruchtbarkeit führen kann, wenn Mäusen täglich 2,5 mg RU486 injiziert wird, was der Menge entspricht, die notwendig ist, um die höchste Rekombinase Aktivität *in vivo* zu erzielen [127].

Bislang ist es nicht gelungen, ein Cre-PR System zu entwickeln, das eine Aktivität wie die Cre-ERT2 Fusionsrekombinase zeigt.

Die größten Einschränkungen im Zusammenhang mit der konditionalen Mutagenese sind die relativ kleine Anzahl verfügbarer gewebespezifischer Promotoren zur Rekombinase Expression in somatischen Zellen und die häufig auftretende Hintergrundrekombination bei fast allen induzierbaren sequenzspezifischen Rekombinationssystemen.

## 1.7 **Gene trapping**

Zwei Hauptstrategien werden eingesetzt, um Mutationen in ES-Zellen zu erzeugen, das oben erläuterte *gene targeting* und eine als *gene trapping* bezeichnete Strategie. Während das *gene targeting* einen spezifischen *targeting* Vektor für jedes Gen benötigt, das inaktiviert werden soll, wird mittels *gene trapping* durch zufällige Insertion allgemein einsetzbarer Kassetten in einen endogenen Locus das betroffene Gen inaktiviert.

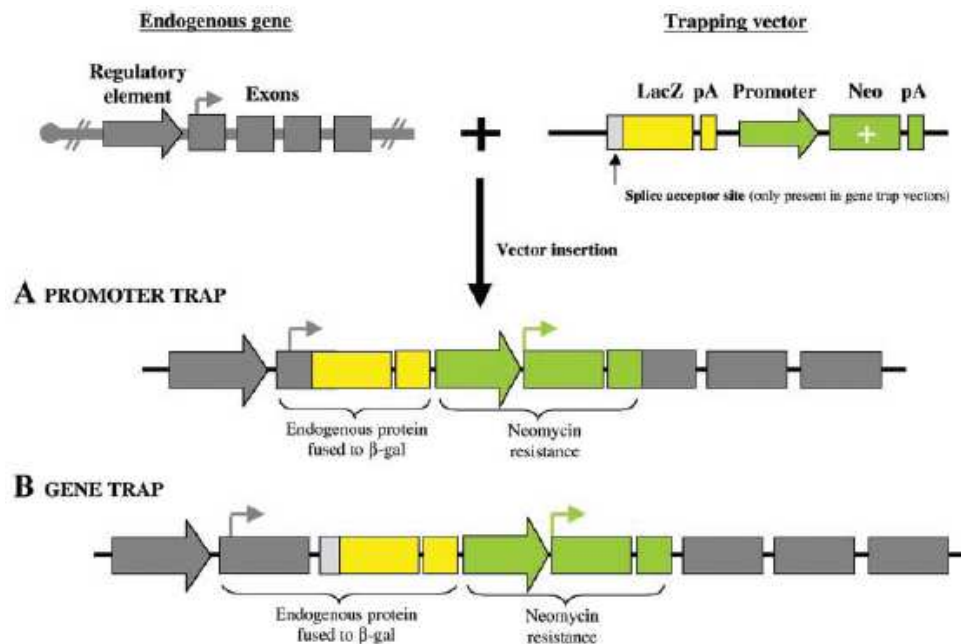
Die zufällige Mutagenese in ES-Zellen ist ein wichtiger Bestandteil einer umfassenden Studie zur funktionellen Aufklärung des Mausgenoms, weil sie die Möglichkeit bietet, Mutationen in einem großen Anteil des Genoms zu erzeugen und dadurch viele Gene identifizieren zu können. Außerdem können durch die Klonierung des mutierten Gens ausgehend von der inserierten Kassette Bibliotheken hergestellt werden, die so genannte *sequence-tagged* Mutationen in ES-Zellen (ESTs) beinhalten [2].

### 1.7.1 **Konventionelle trapping Vektoren**

Im Laufe der Zeit wurden verschiedene *trapping* Vektoren entwickelt, die alle nach dem gleichen Prinzip funktionieren. Sie ermöglichen alle eine schnelle Identifizierung des durch

eine Insertion mutierten Gens mit Hilfe eines *gene trap sequence tag* (GTST) und enthalten einen Reporter, mit dem die endogene Genexpression detektiert werden kann. ES-Zelllinien, die mittels *gene trapping* hergestellt wurden, stellen keine *knock-outs* dar. Die zufälligen Insertionen sind oft mutagen und führen gelegentlich zu Nullmutationen, wenn die Insertion der Kassette in die 5' kodierende Region eines endogenen Gens erfolgt, andere Insertionsorte erzeugen dagegen häufig nur hypomorphe oder sogar dominant negative Mutationen.

Die ursprünglichen *trapping* Vektoren sind *promoter traps* und *gene traps*. Diese Vektoren bestehen aus einem promotorlosen Reportergen und einem Selektionsmarker, der durch einen unabhängigen Promotor kontrolliert wird sowie den entsprechenden polyA Signalen (siehe Abbildung 1.7). Als Antibiotikaresistenzgen dient oft das *neo* Gen und für den Reporter wird bevorzugt die für  $\beta$ -Galactosidase oder GFP kodierende Sequenz eingesetzt. Einige Vektoren enthalten Fusionsproteine wie  *$\beta$ -geo*, das eine Verschmelzung aus *neo* und *lacZ* darstellt. Die Integration von *trapping* Vektoren ins ES-Zellgenom ermöglicht sowohl bei intergenischen als auch bei intragenischen Insertionen aufgrund des autonom regulierten *neo* Gens eine Selektion für resistente Klone. Ein *promoter trap* Vektor muss in die kodierende Sequenz eines endogenen Gens inseriert werden, um die Transkription des Reportergens zu aktivieren, wodurch gleichzeitig die Mutagenese erfolgt. Durch die Aktivität des regulatorischen Elements wird ein Fusionstranskript erzeugt, das aus der stromaufwärts gelegenen endogenen Exonsequenz und dem Markergen besteht. [128]. *Gene trap* Vektoren enthalten stromaufwärts vom Reporter- und Resistenzgen eine *splice acceptor site* und inserieren in Intronsequenzen [129]. Um eine Mutation hervorzurufen, muss die *gene trapping* Kassette im offenen Leserahmen mit dem Zielgen inseriert werden. Weil die Phase, in der ein von einer Kassette getroffenes Intron unterbrochen wird, nicht bekannt ist, werden zur Geninaktivierung immer drei Kassetten für jede mögliche Intronphase benötigt. Zusätzlich muss eine *gene trapping* Kassette in der korrekten Orientierung ins Intron inseriert werden, damit das betroffene Gen inaktiviert werden kann, indem ein Fusionstranskript generiert wird, das aus der stromaufwärts gelegenen kodierenden Sequenz des Zielgens sowie des Selektionsmarkers besteht. Weil die Transkription vorzeitig an dem polyA Signal terminiert wird, kodiert das erzeugte Transkript dann für eine verkürzte und unter Umständen nicht voll funktionsfähige Version des zellulären Fusionsproteins. Von Nachteil bei dem System ist, dass durch die Insertion in Introns im Zuge des alternativen Spleißens die Vektorsequenz herausgeschnitten werden kann, was zu einer niedrigen Anzahl an Wildtyp Transkripten und folglich zu hypomorphen Allelen führt [130].



**Abb. 1.7: Promoter und gene trap Vektoren**

Beide Vektoren enthalten ein *lacZ* Reporter- und ein *neo* Resistenzgen (gelbe bzw. grüne Kästen) mit dem Unterschied, dass dem *promoter trap* Vektor eine *splice acceptor site* (SA) fehlt. Die Insertion erfolgt im Fall (A) in ein Exon des endogenen Gens (graue Kästen) und im Fall (B) in ein Intron, damit ein Fusionsprotein aus dem endogenen Protein und  $\beta$ -gal gebildet und das endogene Gen inaktiviert werden kann. *lacZ*,  $\beta$ -Galactosidase Gen; *pA*, Polyadenylierungssignal; *Neo*, Neomycin Resistenzkassette;  $\beta$ -gal,  $\beta$ -Galactosidase; (aus [3]).

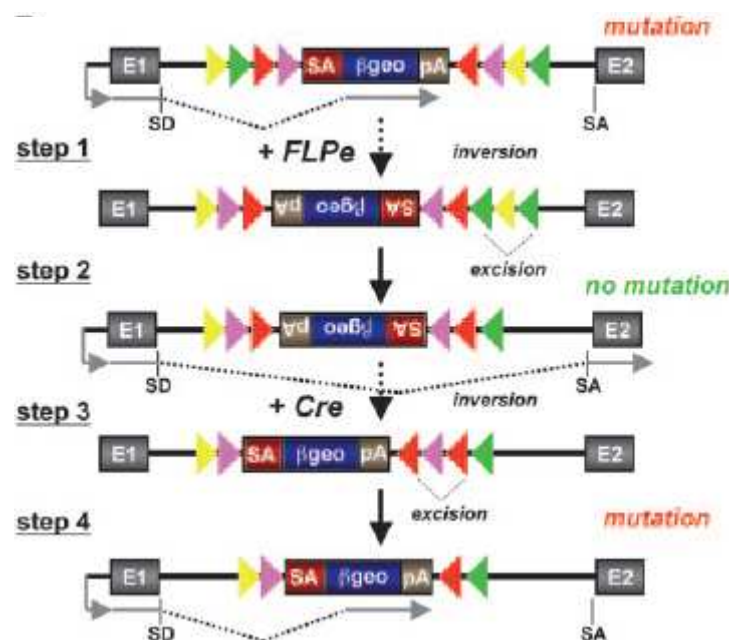
Die größte Anzahl von zufälligen Insertionen erfolgt bislang mittels  *$\beta$ -geo gene trap* Vektoren. Der Nachteil der *promoter/gene trapping* Methode ist, dass in ES-Zellen lediglich aktive Gene detektiert werden können, weil die mRNA des (Selektions)Markers nur dann transkribiert wird, wenn der Vektor innerhalb eines transkriptionell aktiven Locus inseriert. Obwohl *promoter/gene traps* effektiv bei der Inaktivierung von Genen sind, können mit dieser Strategie keine Klone mit Insertionen innerhalb von inaktiven Genen identifiziert werden [131]. Da angenommen wird, dass etwa 40-50% des ES-Zellgenoms transkriptionell inaktiv vorliegt, haben Niwa und Kollegen so genannte *polyA trap* Vektoren entwickelt, die es ermöglichen, Gene unabhängig vom Expressionsstatus zu mutieren [132]. In diesen Vektoren reguliert ein konstitutiv aktiver Promotor die Expression eines Resistenzgens, dessen polyA Signal durch eine *splice donor site* ersetzt wurde, um Spleißen mit stromabwärts gelegenen Exonen zu ermöglichen. Die mRNA des Selektionsgens kann nur durch ein endogenes polyA Signal eines mutierten Gens unabhängig von seinem Expressionsstatus in der Zielzelle stabilisiert werden, um resistente Klone zu erzeugen [132, 133]. Dabei führen nur Insertionen in intragenische Regionen zur Entstehung resistenter Klone, während intergenische Insertionen unentdeckt bleiben. Tatsächlich haben diese Vektoren das Potential Gene zu mutieren, deren Mutagenese mit anderen Strategien nicht erfolgreich war. Allerdings konnte beobachtet werden, dass *polyA gene trap* Insertionen oft am 3'-Ende von Genen erfolgen

[2]. Eine Studie, die von Shigeoka und Kollegen durchgeführt wurde, hat ergeben, dass diese Beobachtung damit zusammenhängt, dass die meisten Insertionen in weiter stromaufwärts gelegene Regionen zur Aktivierung eines Prozesses führen, der zum Abbau entsprechender Fusionstranskripte führt, wodurch eine Selektion für 5' mutierte Gene nicht möglich ist [134]. Dieser Mechanismus wird als *nonsense mediated mRNA decay* (NMD) (siehe unten) bezeichnet und ist für die Degradierung von mRNAs verantwortlich, die möglicherweise schädliche *nonsense* Mutationen tragen [135]. Um NMD zu entgehen, wurde ein modifizierter *polyA trap* Vektor, der *UPATrap*, generiert. Der Vektor enthält eine loxP flankierte IRES Sequenz stromaufwärts von Initiationscodons in allen drei Leserastern, die zwischen das Resistenzgen und die *splice donor site* des konventionellen *polyA trap* Vektors eingesetzt wurde [134]. Die stromabwärts von dem Terminationscodon des Selektionsgens eingeführte IRES Sequenz, die die Expression zweier Proteine von einer mRNA erlaubt [136], verhindert eine NMD Aktivierung und ermöglicht die Translation der mRNA. Mit Hilfe dieser Strategie können inaktive Gene mutiert werden, ohne dass der Vektor bevorzugt in eine bestimmte Stelle inseriert [134]. Konventionelle Vektoren, die für *gene trapping* Strategien eingesetzt werden, haben den Nachteil, dass jeweils Vektoren für alle drei möglichen Intronphasen und Leseraster hergestellt werden müssen, um eine Inaktivierung von jedem zufällig mutierten Zielgen sicherzustellen. Außerdem müssen sie in der richtigen Orientierung inseriert werden, um ihre Wirkung entfalten zu können. Die meisten *gene trapping* Vektoren sind außerdem auf die Aktivität des Zielgens angewiesen, um eine Mutation nachweisen zu können. Ein weiterer Nachteil von herkömmlichen Vektoren zur ungezielten Mutagenese ist, dass sie nicht zur konditionalen Geninaktivierung geeignet sind.

### 1.7.2 Konditionale *gene trapping* Vektoren

Ein beachtliches Interesse gilt der Herstellung von *gene trapping* Vektoren, die mittels konditionalen Strategien für die Erzeugung von Null- oder gewebespezifischen oder induzierbaren Mutationen eingesetzt werden können. Solche Vektoren werden als *conditional ready* bezeichnet. Schnütgen und Kollegen haben die "FLE<sub>x</sub>" *switch* Strategie in einem *gene trapping* Vektor eingesetzt, der für die konditionale Mutagenese in ES-Zellen entwickelt wurde [137]. Dieser Vektor besteht aus einer SA- $\beta$ -geo-pA Kasette, die von heterotypen FRT/F3 und loxP/lox5171 Rekombinase Erkennungssequenzen in entgegengesetzter Orientierung geflext wird. Die konditionale Kasette erlaubt zwei gerichtete aufeinander folgende Cre und FLPe vermittelte Inversionsreaktionen (siehe Abbildung 1.8). Nach einer Integration in ein Intron eines Gens, wodurch eine Mutation ausgelöst wird, invertiert FLPe die Kasette in eine *antisense* Orientierung auf den nicht kodierenden DNA Strang. Durch das endogene Spleißen wird die Kasette entfernt und

die normale Genexpression wiederhergestellt. Eine zweite durch Cre induzierte Inversion platziert die Kassette wieder zurück auf den kodogenen Strang, was eine neue Mutation verursacht. Während der Inversionsreaktionen werden heterotype RTs ausgeschnitten, so dass die Kassette nicht noch einmal invertiert werden kann [137]. Dieser *gene trapping* Vektor erlaubt eine Identifizierung von G418 resistenten ES-Zellklonen, eine Inaktivierung der durch die Insertion der Kassette hervorgerufenen Mutation mittels FLPe vermittelter Rekombination vor der Injektion der isolierten Zellen in Blastozysten und die Reaktivierung der Mutation zu einem festgelegten Zeitpunkt und/oder in einem ausgewählten Gewebe der resultierenden Maus durch Verpaarung mit einer entsprechenden Cre transgenen Maus. Ein Nachteil der Kassette ist, dass für jede der drei möglichen Intronphasen eines Zielgens ein entsprechendes Konstrukt erzeugt werden muss. Es wäre daher von Vorteil, wenn ein System zur Verfügung stehen würde, dass unabhängig von der Intronphase eines beliebigen Gens dessen konditionale Inaktivierung ermöglicht.



**Abb. 1.8. Konditionale Geninaktivierung mit einer *gene trapping* Kassette**

Nach Insertion der geflexte SA- $\beta$ -geo-pA Kassette in ein Intron eines exprimierten Gens wird eine Mutation erzeugt. Durch eine FLPe vermittelte Inversion wird die Kassette invertiert, so dass sie im nicht kodierenden Strang liegt und herausgespleißt werden kann, wodurch die normale Genexpression wiederhergestellt wird. Durch eine Cre vermittelte Inversion wird die Kassette wieder in den kodierenden Strang platziert, was wieder zu einer Mutation führt. Transkripte sind als graue Pfeile gekennzeichnet. FRT (gelbe Dreiecke) und F3 (grüne Dreiecke) heterotype Zielsequenzen für die FLPe Rekombinase; loxP (rote Dreiecke) und lox511 (violette Dreiecke) heterotype Zielsequenzen für die Cre Rekombinase; SA, splice acceptor site; SD, splice donor site;  $\beta$ -geo, Fusion aus dem  $\beta$ -Galactosidase Gen und dem Neomycin Phosphotransferase Gen; pA, Polyadenylierungssignal (aus [137]).

Die Kombination aus sequenzspezifischer Rekombination und *gene targeting* oder *gene trapping* Strategien in murinen embryonalen Stammzellen führte zur Entwicklung einer präzisen Technologie, um das Mausgenom zu manipulieren. Eine eindrucksvolle

Anwendung dieser Technik liegt in der konditionalen Mutagenese, die eine kontrollierbare Inaktivierung spezifischer Gene in der Maus oder in Zellen für Funktionsstudien erlaubt. Weil das konditionale *gene targeting* sehr genaue Analysen ermöglicht, sind internationale Forschungsgruppen bemüht, konditionale Allele für jedes Protein kodierende Gen im Mausgenom zu erzeugen. Mit dem Einsatz eines breiten Spektrums an *trapping* Vektoren erfolgt im *International Gene Trap Consortium* (IGTC) der erste Durchgang der Genommutagenese durch die Generierung zufälliger Mutationen, bevor z.B. das *European Conditional Mouse Mutagenesis* Projekt (EUCOMM) die genauen Analysen zur Aufklärung der Genfunktion durchführt [138]. Die bislang erhältlichen *gene trapping* Linien werden auf der IGTC Webseite <http://www.genetrap.org> zusammengefasst [139].

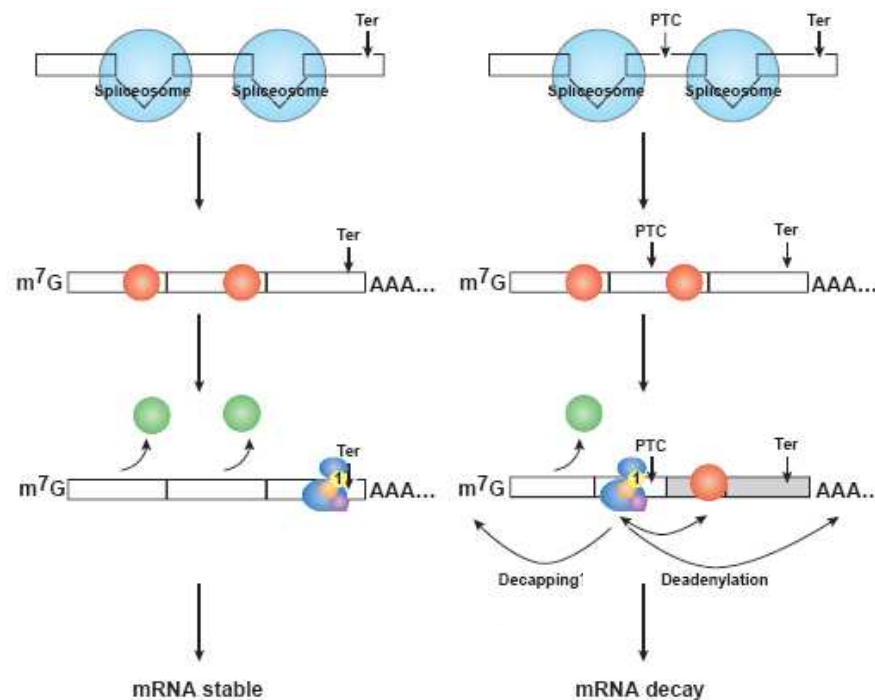
### 1.8 ***Nonsense mediated mRNA decay (NMD)***

Im Verlauf der Genexpression kommt es in Zellen zu Fehlern. Einige Fehler sind im Genom verschlüsselt und können zu Krankheiten führen. Andere Schäden treten ein, weil metabolische Prozesse nicht wirksam oder ungenau ablaufen. Als Konsequenz haben Zellen Mechanismen entwickelt, um Schäden zu minimieren, die entstehen würden, wenn Fehler unerkannt blieben. Ein solcher Mechanismus zur Qualitätskontrolle ist *nonsense mediated mRNA decay* (NMD). Der Prozess kontrolliert die mRNA während der Translation und degradiert solche mRNAs, die aufgrund frühzeitiger Termination der Translation zur Synthese abweichender Proteine führen würden. Der Prozess reguliert aber auch natürlich vorkommende alternativ gespleißte mRNAs [140]. Es wird deshalb angenommen, dass die Verknüpfung aus alternativem Spleißen und NMD ein Mittel zur Regulation der Genexpression darstellt [141]. NMD wurde in allen bislang untersuchten eukaryotischen Zellen nachgewiesen, zuerst in *Saccharomyces cerevisiae* [142] und später auch in *Saccharomyces pombe* [143] sowie in *Caenorhabditis elegans* [144], *Drosophila melanogaster* [145], *Arabidopsis thaliana* [146] und auch in Säugerzellen [147], wobei sich der Mechanismus in Säuger- und nicht Säugerzellen unterscheidet [148].

*Nonsense mediated mRNA decay* (NMD) in Säugerzellen wird durch prämatüre Terminationscodons (PTCs) ausgelöst. Als PTC werden Stopcodons bezeichnet, die innerhalb der mRNA stromaufwärts vor dem eigentlichen Terminationssignal lokalisiert sind. PTC leiten eine vorzeitige Termination der Translation ein, wenn sie mehr als 50-55 nt stromaufwärts von der nächsten durch Spleißen generierten Exon-Exon Grenze liegen. Diese Verbindungen werden beim Spleißvorgang erkannt und bleiben durch einen *exon junction complex* (EJC) gekennzeichnet, der sich in der Regel während der ersten Translationsrunde wieder ablöst. EJCs sind Proteinkomplexe, die sich nach dem prä-mRNA Spleißen 20-24 nt stromaufwärts vor den Exon-Exon Grenzen neu synthetisierter



mRNAs anlagern. Liegen jedoch Transkripte mit PTCs vor, bleiben diese durch EJC's markiert. EJC's rekrutieren zusätzlich *up-frameshift* (UPF) Proteine, die zur Identifizierung von mRNAs mit PTCs beitragen und die für den Abbau durch NMD erforderlich sind. Die markierte mRNA wird dann von beiden Seiten in einem Nukleus oder Zytoplasma assoziierten NMD Prozess mittels *decapping*, Deadenylierung und exonukleolytischem Verdau degradiert [149]. Der für Säugerzellen geltende NMD Mechanismus ist in Abbildung 1.9 vereinfacht dargestellt.



**Abb. 1.9: Nonsense mediated mRNA decay (NMD)**

Normalerweise sind Stopcodons im letzten Exon eines Gens lokalisiert (links), wohingegen NMD aktivierende PTCs weiter stromaufwärts liegen (rechts). Ein Stopcodon gilt als normal, wenn mehr als 50-55 nt stromabwärts kein Intron folgt. Während der Spleißreaktion wird ein EJC (*exon junction complex*) (rot) 5' von Exon-Exon Grenzen angelagert (links und rechts). Während der Translation einer PTC freien mRNA werden die EJC's (grün) durch das Ribosom entfernt und die mRNA bleibt stabil (links). Wenn das Ribosom auf ein PTC stromaufwärts des letzten EJC trifft, wird NMD ausgelöst und das mutierte Transkript wird mittels *decapping* und Deadenylierung degradiert. Ter, Terminationscodon; PTC, präkoxes Terminationscodon (verändert aus [150]).

## 1.9 Aufgabenstellung

Seit der ersten erfolgreichen Generierung einer konditionalen Mutation in der Maus [75], ist die Anzahl von *knock-out* Mäusen stetig gestiegen [151]. Eine Mauslinie, die ein gefloxtes Allel trägt, kann unterschiedliche konditional inaktivierte Modelle erzeugen, abhängig von dem Cre transgenen Mausstamm, mit dem sie verpaart wird. In diesem Zusammenhang kann die Studie der Genfunktion aus verschiedenen Blickwinkeln in aufeinander folgenden Experimenten erfolgen. Angesichts des zunehmenden Interesses für die Analyse aller Protein kodierender Gene ist die Entwicklung von Strategien erforderlich, die die Herstellung von *knock-out* Mäusen vereinfachen und beschleunigen.

- 1) Für die Herstellung von transgenen Cre Mauslinien, die entweder eine konstitutiv aktive Cre Rekombinase oder ein induzierbares Cre-LBD Fusionsprotein unter der Kontrolle eines ubiquitär oder gewebespezifisch aktiven Promotors in der Maus exprimieren, müssen jeweils zwei unabhängige Konstrukte generiert werden. Um die Herstellung transgener Cre Mäuse zu vereinfachen, wurde ein bifunktionales Cre Konstrukt generiert, das von der Expression eines Hormon abhängigen Fusionsproteins durch FLP vermittelte Rekombination auf die Expression eines konstitutiv aktiven Fusionsproteins *in vivo* umgeschaltet werden kann (regulierbar zu konstitutiv aktiv) [152]. Das bifunktionale Konstrukt ist eine Fusion aus der Cre Rekombinase mit der Liganden bindenden Domäne des humanen mutierten Östrogenrezeptors (ERT2) und einem Kernlokalisierungssignal (NLS), wobei Cre-ERT2 die Liganden induzierbare und Cre-NLS die konstitutiv aktive Form darstellt. Damit *in vivo* von der Expression eines induzierbaren auf die Expression eines konstitutiv aktiven Fusionsproteins umgestellt werden kann, muss die zwischen Cre und NLS lokalisierte ERT2 Sequenz entfernt werden. Zu diesem Zweck liegt die Domäne mit FRT Zielsequenzen [22, 23] flankiert vor, so dass sie nach einer FLP vermittelten Rekombination deletiert werden kann.

Da mit der induzierbaren Cre-FRT-ERT2 Rekombinaseform in Abwesenheit des Induktors 4-OHT in einem initialen Experiment ein Rekombinationshintergrund beobachtet werden könnte [152], sollen in der vorliegenden Arbeit weitere bifunktionale Konstrukte generiert werden, um zu untersuchen, ob das Signal-zu-Rausch Verhältnis (Liganden induzierte Rekombination zu Hintergrundrekombination) verbessert werden kann. Die neuen Konstrukte sollen aus einer Fusion von Cre mit verschiedenen Liganden bindenden Domänen humaner Hormonrezeptoren und einem Kernlokalisierungssignal bestehen und ebenfalls die Expression einer Hormon abhängigen und nach FRT vermittelter Rekombination einer konstitutiv aktiven Fusionsrekombinase erlauben. Zusätzlich soll ein Konstrukt erzeugt werden, in dem von der Expression eines konstitutiv aktiven Cre-NLS Fusionsproteins Rekombinase vermittelt auf die Expression eines Liganden abhängigen Cre-ERT2 Fusionsenzym umgeschaltet werden kann (konstitutiv aktiv zu regulierbar). Alle hergestellten Konstruktvarianten sollen *in vitro* auf ihre Funktionalität untersucht werden. Mit dem Konstrukt, das das beste Signal-zu-Rausch Verhältnis zeigt, also eine hohe Aktivität nach Induktion aber eine niedrige Hintergrundaktivität, soll ein BAC Transgen generiert werden, der mittels Mikroinjektion in Oozyten zur Erzeugung von Mäusen führen soll, die von der Expression eines Fusionsproteins Rekombinase vermittelt *in vivo* auf die Expression eines anderen Fusionsproteins umgeschaltet werden können.

- 2) Eine konditionale Mutagenese von Genen kann mittels *gene targeting* als auch *gene trapping* Methoden erfolgen. Die gezielte Mutagenese (*gene targeting*) beruht auf der homologen Rekombination (HR) eines DNA Moleküls mit einem spezifischen Locus, während die ungerichtete Mutagenese (*gene trapping*) auf der zufälligen Insertion von DNA Sequenzen ins Genom beruht. Für die Herstellung von *gene targeting* Konstrukten, die zur konditionalen Geninaktivierung mittels Deletion eines Exons genutzt werden, ist aufgrund der Intronphasen eine genaue Kenntnis des zu mutierenden Gen erforderlich (siehe oben). Konventionelle *gene trapping* Konstrukte, die für ungerichtete Mutagenese von Genen eingesetzt werden, müssen in drei Ausführungen für jede der drei möglichen Intronphasen eines Zielgens erzeugt werden (siehe oben). Um die Herstellung von *targeting* und *trapping* Konstrukten zu vereinfachen, soll eine Strategie entwickelt werden, die sowohl zur gezielten konditionalen Mutagenese mittels homologer Rekombination als auch zur ungerichteten konditionalen Mutagenese von Genen unabhängig von der Intronphase eingesetzt werden kann.

*Nonsense mediated mRNA decay* (NMD) ist ein natürlicher zellulärer Prozess, der gewährleistet, dass nur korrekt prozessierte RNAs translatiert werden (siehe oben). NMD wird auch mit der Beobachtung in Verbindung gebracht, dass bei *knock-out* Mäusen, die durch Deletion eines Exons erzeugt wurden, nicht nur das entsprechende Protein sondern auch die mRNA nicht nachweisbar ist. Die Deletion eines Exons führt in einem solchen Fall zu einer Verschiebung des ORF (*open reading frame*), so dass in dem neu gebildeten Leseraster Stopcodons entstehen können, die als PTCs erkannt werden, wenn sie 50-55 nt von der nächsten *splice donor site* entfernt liegen (siehe oben). Ein solcher Effekt wurde in unserem Labor bei einer generierten  $\beta_7$ -Integrin Mutante beobachtet, bei der durch die Einführung eines Stopcodons in das vorletzte Exon die zytoplasmatische Domäne des Proteins deletiert werden sollte. Statt der erwarteten Expression der mutierten Form des Rezeptors konnte gar kein  $\beta_7$ -Integrin auf der Oberfläche von Lymphozyten identifiziert werden. Nach der Durchführung eines Northern Blot konnte gezeigt werden, dass keine  $\beta_7$ -Integrin RNA in den Zellen gebildet wird [153]. Aufgrund dieser Beobachtung soll eine auf NMD basierende Kasette zur konditionalen Inaktivierung von Zielgenen in der Maus entwickelt werden, die auf dem Einsatz eines *nonsense mediated mRNA decay* (NMD) vermittelnden Exons beruht und sowohl für die gezielte als auch ungerichtete Mutagenese genutzt werden kann. Um eine konditionale Inaktivierung des endogenen Locus nach erfolgter Mutagenese zu ermöglichen, soll die induzierbare Kasette mit Paaren von mutanten Erkennungssequenzen für eine oder mehrere Rekombinasen flankiert werden, die eine irreversible Inversion der dazwischen liegenden DNA

ermöglichen. Es sollen verschiedene Exons für die Konstruktion der induzierbaren Kassette eingesetzt werden, die anschließend auf ihre NMD vermittelnde Wirkung eine Degradierung der entsprechenden mRNA zu induzieren, was im Zusammenhang mit *gene targeting* oder *trapping* Experimenten zu einer Geninaktivierung führt, getestet werden sollen.

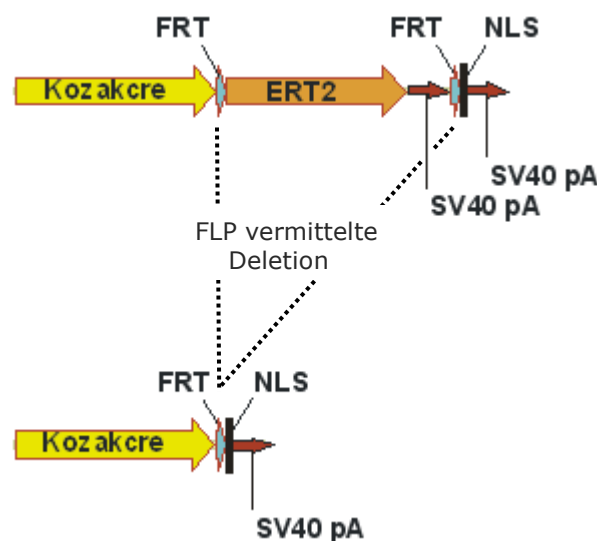
## 2. Ergebnisse

### 2.1 Bifunktionale Cre Expressionskonstrukte

Bei einem bifunktionalen Cre Expressionskonstrukt handelt es sich um eine DNA Kasette, mit der *in vivo* von der Expression eines Hormon abhängigen Cre Fusionsproteins durch FLP vermittelte Rekombination auf die Expression einer konstitutiv aktiven Fusionsrekombinase umgeschaltet werden kann. Das bifunktionale Cre Expressionskonstrukt wurde entwickelt, um die Generierung gewebespezifischer und gewebespezifisch induzierbarer Cre Mauslinien, für deren Herstellung bislang zwei unabhängige Cre Konstrukte erzeugt werden müssen, mit Hilfe nur eines Expressionskonstrukts zu ermöglichen. Weil die Liganden induzierbare Fusionsrekombinase eine Aktivität im nicht induzierten Zustand zeigt [152], sollen im Zuge der vorliegenden Arbeit modifizierte bifunktionale Cre Konstruktvarianten hergestellt werden, um zu untersuchen, ob es möglich ist, durch zusätzliche Liganden bindende Domänen von Hormonrezeptoren das Signal-zu-Rausch Verhältnis (Liganden induzierte Rekombination zu Hintergrundrekombination) der Fusionsrekombinase zu verbessern.

#### 2.1.1 Bifunktionale Cre Expressionskonstrukte mit multiplen Liganden bindenden Domänen

Als Ausgangspunkt für die Herstellung weiterer bifunktionaler Cre Expressionskonstrukte diene die Cre-FRT-ERT2-FRT Expressionskassette (regulierbar zu konstitutiv aktiv) [152], deren Aufbau zur Veranschaulichung vor und nach FLP vermittelter Deletion der FRT flankierten ERT2 Region in Abbildung 2.1.1 schematisch dargestellt ist.



**Abb. 2.1.1: Funktionswechsel des bifunktionalen Cre-FRT-ERT2-FRT Konstrukts**

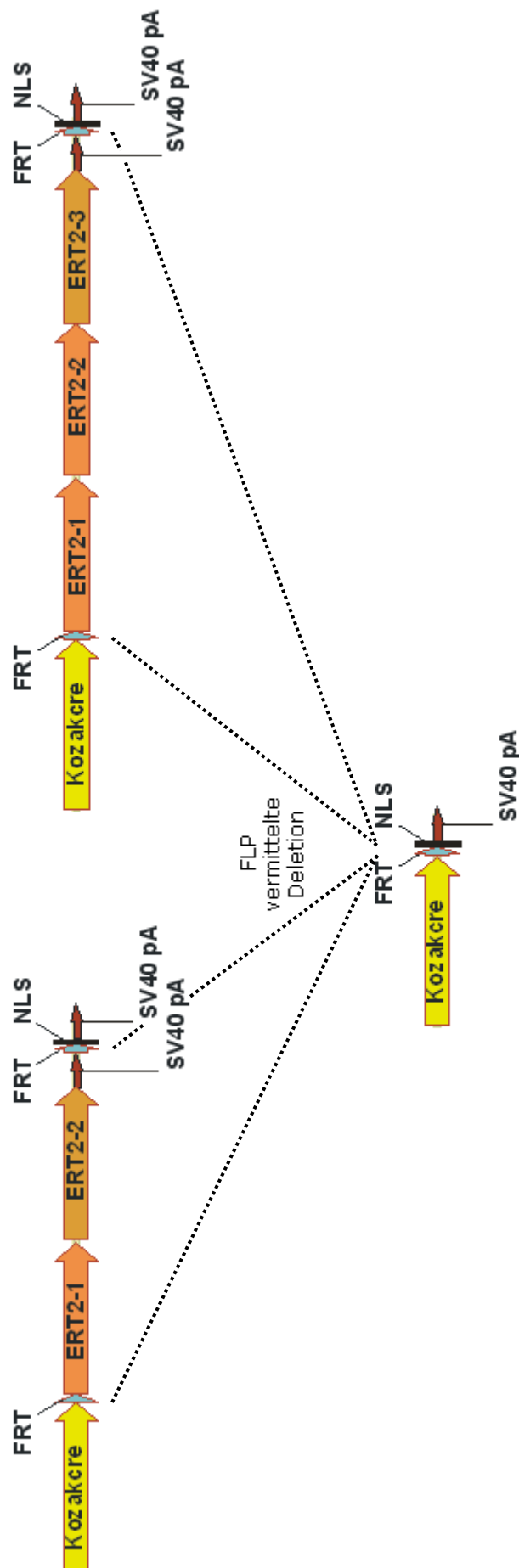
Das induzierbare Cre-FRT-ERT2-FRT Konstrukt (oben) kann durch FLP vermittelte Deletion der FRT flankierten ERT2 Domäne in das konstitutiv aktive Cre-FRT-NLS Konstrukt (unten) umgeschaltet werden (regulierbar zu konstitutiv aktiv).

Um eine Verringerung der Hintergrundaktivität zu erzielen, wurden modifizierte bifunktionale Cre Expressionskonstrukte hergestellt, die aus multiplen Fusionen von Liganden bindenden Domänen mit der Cre Rekombinase bestehen.

#### **2.1.1.1 Bifunktionale Cre Expressionskonstrukte mit multiplen ERT2 Domänen**

##### **Multiple ERT2 Domänen am C-Terminus der Cre Rekombinase**

Um zu untersuchen, ob die Hintergrundaktivität einer Hormon abhängigen bifunktionalen Fusionsrekombinase weiter reduziert werden kann, wurden durch Modifizierung der Cre-FRT-ERT2-FRT Kasette bifunktionale Konstrukte hergestellt, die aus zwei bzw. drei FRT flankierten ERT2 Domänen fusioniert mit dem C-Terminus der Cre Rekombinase bestehen. Da die ERT2 Sequenz des ursprünglichen Konstrukts am 3'-Ende ein Stopcodon enthält, musste ein neues um eine Aminosäure verkürztes ERT2 Fragment erzeugt werden, um die Expression der Cre Rekombinase mit mehreren ERT2 Domänen zu erlauben. Das entsprechende ERT2\* Fragment, das aus den Aminosäuren 288-594 besteht, wurde mit Hilfe der Primer ert2-P1 und ert2\*-P2 (siehe 7.1) aus der genomischen DNA von K14crem Mäusen, die die ERT2 Sequenz enthalten, mittels PCR amplifiziert und anschließend sequenziert. Der Klonierungsvektor, der das bifunktionale Cre-FRT-ERT2-FRT Konstrukt enthält [152], wurde so geschnitten, dass das ERT2\* Fragment stromaufwärts von der ERT2 Domäne aber stromabwärts von der ersten FRT Erkennungssequenz kloniert werden konnte, ohne das bestehende Leseraster zu unterbrechen. Mit Hilfe von Restriktionsanalysen wurden anschließend Transformanten isoliert, die eine bzw. zwei weitere ERT2\* Domänen in der richtigen Orientierung enthalten. Da beide bzw. alle drei ERT2 Domänen der jeweiligen bifunktionalen Kasette FRT flankiert vorliegen, können sie durch eine FLP vermittelte Rekombination deletiert werden, wodurch aus dem induzierbaren Cre Protein eine Variante entsteht, die das konstitutiv aktive Cre Transgen exprimiert. Der Aufbau der induzierbaren Cre-FRT-2xERT2-FRT und Cre-FRT-3xERT2-FRT Konstrukte vor und nach FLP vermittelter Rekombination ist in Abbildung 2.1.2 schematisch gezeigt.



**Abb. 2.1.2: Funktionswechsel der bifunktionalen Cre-FRT-2xERT2-FRT und Cre-FRT-3xERT2-FRT Konstrukte**

Sowohl das induzierbare Cre-FRT-2xERT2-FRT Konstrukt als auch das induzierbare Cre-FRT-3xERT2-FRT Konstrukt (links) kann durch FLP vermittelte Deletion der FRT flankierten ERT2 Domänen in das konstitutiv aktive Cre-FRT-NLS Konstrukt (rechts) umgeschaltet werden. ERT2\* Domänen ohne ein Stopcodon sind durch orangefarbene und ERT2 Domänen mit Stopcodon am 3'-Ende durch braune Pfeile repräsentiert.

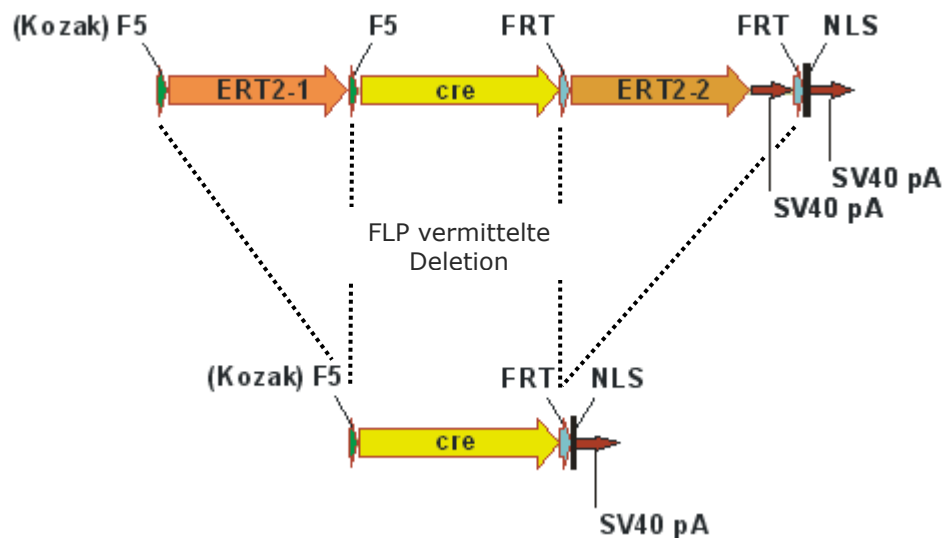
### ERT2 Domänen am N- und C-Terminus der Cre Rekombinase

Cre Expressionsvarianten, die sowohl am N- als auch am C-Terminus mit einer mutierten LBD eines murinen oder humanen Östrogenrezeptors fusioniert worden sind, zeigten eine effiziente Cre Rekombination in Anwesenheit des Liganden und keine detektierbare Hintergrundaktivität der Rekombinase im nicht induzierten Zustand [100, 116]. Als weiteres bifunktionales Konstrukt wurde eine vergleichbare Kasseette hergestellt, die ebenfalls von der Expression eines induzierbaren in ein konstitutiv aktives Cre Protein mittels FLP vermittelter Rekombination umgeschaltet werden kann und neben einer C-terminalen eine weitere ERT2 Domäne am N-Terminus enthält. Weil die Generierung einer konstitutiv aktiven Rekombinaseform auf der Deletion der ERT2 kodierenden Bereiche basiert, muss auch die N-terminale ERT2 Domäne flankiert vorliegen. Um eine vollständige Deletion der Kasseette auszuschließen, wurden mutierte FRT Sequenzen, die so genannten F5 Erkennungssequenzen [49], zur Begrenzung der N-terminalen ERT2 Sequenz verwendet. Mutierte FRT Bindungsstellen dienen wie Wildtyp FRT Stellen als Zielsequenzen für die FLP Rekombinase. Würden jeweils Wildtyp FRT Motive zur Begrenzung beider ERT2 Sequenzen genutzt werden, könnten unter Umständen partielle FLP vermittelte Rekombinationseignisse erfolgen, wodurch nicht nur die ERT2 Regionen, sondern auch der gesamte flankierte ERT2-Cre-ERT2 Bereich entfernt würde. Weil eine Rekombination nur zwischen Paaren homotyper aber nicht heterotyper Bindungsstellen erfolgt [26], kann die Cre Sequenz, die nach erfolgter Deletion der ERT2 Domänen von je einem F5 und FRT Element flankiert vorliegt, nicht mehr herausgeschnitten werden, so dass auf diese Weise die Expression einer konstitutiv aktiven Cre Rekombinase sichergestellt wird.

Für die Herstellung eines bifunktionalen doppelt fusionierten Cre Expressionsproteins musste das ursprüngliche Liganden induzierbare Cre-FRT-ERT2-FRT Konstrukt abgesehen von der Erweiterung mit einer zusätzlichen F5 flankierten ERT2\* Sequenz ohne ein Stopcodon so modifiziert werden, dass die Kozaksequenz und das Initiationscodon am 5'-Ende des Konstrukts lokalisiert sind. Um die Expression beider Rekombinaseformen zu gewährleisten, durfte das Leseraster dabei nicht unterbrochen werden. Zunächst einmal wurde ein neues für Cre ohne ATG und Kozaksequenz kodierendes Fragment aus dem Plasmid pKozakcre mit Hilfe der Primer cre\*-P1 und crefrt-P2 (siehe 7.1) per PCR amplifiziert und sequenziert. Die modifizierte Cre\* Sequenz mit C-terminalem FRT Element wurde dann in den Klonierungsvektor, der das vollständige Cre-FRT-ERT2-FRT Konstrukt enthält, an die Stelle der ursprünglichen Kozakcre mit FRT Sequenz ligiert, die zuvor unter Verwendung geeigneter Restriktionsenzyme entfernt worden ist. Im zweiten Schritt erfolgte die Amplifizierung der ERT2\* Domäne aus genomischer K14crem Maus DNA mit den Oligonukleotiden



kf5ert2\*-P1 und ert2\*f5-P2 (siehe 7.1). Die überstehenden nicht komplementären Bereiche der *forward* P1- bzw. *reverse* P2-Primer beinhalten die Sequenzen für das Kozaksignal, das Initiationscodon sowie das 5' F5 bzw. das 3' F5 Element und ermöglichten so die direkte Generierung der N-terminalen F5 flankierten ERT2\* Domäne. Nach Sequenzanalyse wurde das F5-ERT2\*-F5 Fragment in eine ausgewählte Restriktionsstelle des bereits teilweise modifizierten Klonierungsvektors in richtiger Orientierung ligiert. Bei dieser Rekombinasevariante sind neben dem FRT Motiv zwei F5 Erkennungssequenzen zusätzliche Bestandteile des Fusionsproteins. Durch eine FLP vermittelte Deletion der F5 und FRT flankierten ERT2 Domänen kann das F5-Cre-FRT-NLS Konstrukt erzeugt werden. Diese konstitutiv aktive Rekombinase enthält im Vergleich zu der vorangegangenen Cre-FRT-NLS Form ein zusätzliches F5 Element am N-Terminus. Der Aufbau des bifunktionalen doppelt fusionierten Cre Expressionskonstrukts vor und nach FLP vermittelter Rekombination wird in Abbildung 2.1.3 dargestellt.



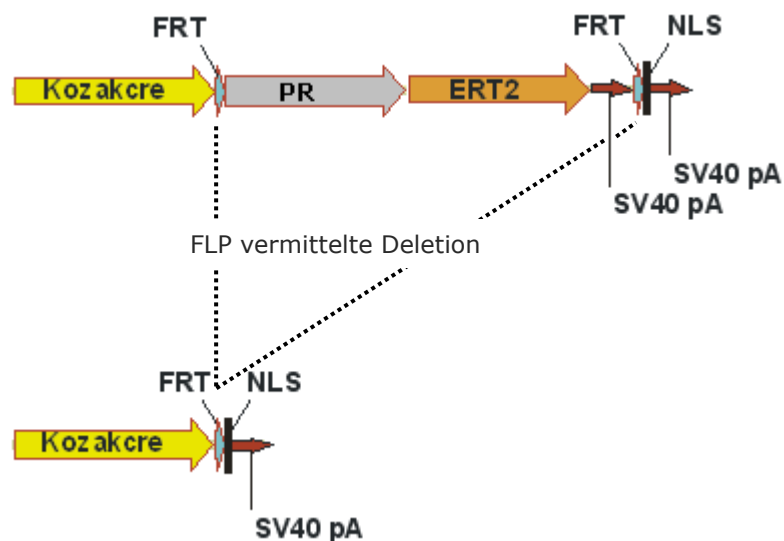
**Abb. 2.1.3: Funktionswechsel des bifunktionalen F5-ERT2-Cre-ERT2-FRT Konstrukts**

Das induzierbare F5-ERT2-Cre-ERT2-FRT Konstrukt (oben) kann durch FLP vermittelte Deletion der F5 (grün) flankierten ERT2\* und der FRT (blau) flankierten ERT2 Domäne in das konstitutiv aktive F5-Cre-FRT-NLS Konstrukt (unten) umgeschaltet werden. Der orangefarbene Pfeil repräsentiert die ERT2 Domäne ohne und der braune Pfeil die ERT2 Domäne mit Stopcodon am 3'-Ende.

### 2.1.1.2 Bifunktionales Cre Expressionskonstrukt mit ERT2 und PR Domänen

Bislang werden Cre Proteine zur Hormon abhängigen Regulation der Rekombination herangezogen, die entweder auf Fusionen mit mutierten LBDs von Östrogen- oder Progesteronrezeptoren basieren [111, 126]. Um zu untersuchen, ob die Hintergrundaktivität durch die Verwendung von zwei unterschiedlichen LBDs noch wirksamer gesteuert werden kann, wurde ein bifunktionales Konstrukt entwickelt, das ein Fusionsprotein aus Cre mit der PR (Progesteronrezeptor) und ERT2 LBD in einem ORF exprimiert. Die gewählte Sequenz für die LBD des Progesteronrezeptors umfasst die

Aminosäuren 676-914 [126, 154]. Das Fragment ohne ein Stopcodon am 3'-Ende wurde mit den Oligonukleotiden pr676-P1 und pr914-P2 (siehe 7.1) aus dem Plasmid pBKK14-Cre19-PR676-914-bpA [154] amplifiziert, sequenziert und in eine Restriktionsschnittstelle stromaufwärts der ERT2 Sequenz des Cre-FRT-ERT2-FRT Klonierungsvektors ligiert, so dass es in der gleichen Orientierung und im gleichen ORF wie die übrigen Komponenten des Konstruktes vorliegt. Das Cre-FRT-PR-ERT2 Fusionsprotein muss zur Aktivierung der Rekombinase mit 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT) und Mifepriston (RU486) induziert werden. Die PR und ERT2 Domänen liegen in dem induzierbaren Cre Expressionskonstrukt gemeinsam von FRT Erkennungssequenzen flankiert vor, so dass sie während einer FLP vermittelten Rekombinationsreaktion gleichzeitig deletiert werden können, wodurch die Hormon abhängige Cre Expressionskassette so modifiziert wird, dass die resultierende Variante eine konstitutiv aktive Cre-FRT-NLS Rekombinase exprimiert. Die Zusammensetzung der einzelnen Komponenten in dem Liganden induzierbaren bifunktionalen Cre-FRT-PR-ERT2-FRT und dem mittels FLP vermittelter Deletion der LBDs erzeugten konstitutiv aktiven Cre-FRT-NLS Konstrukt wird in Abbildung 2.1.4 verdeutlicht.

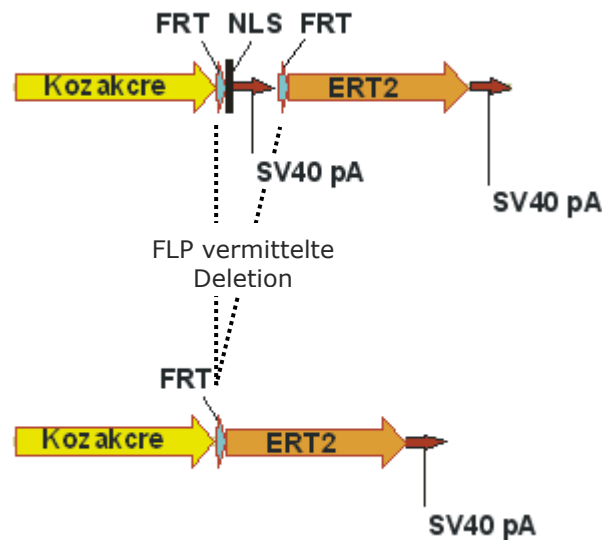


**Abb. 2.1.4: Funktionswechsel des bifunktionalen Cre-FRT-PR-ERT2-FRT Konstrukts**

Das durch 4-OHT und RU486 induzierbare Cre-FRT-PR-ERT2-FRT Konstrukt (oben) kann durch die FLP vermittelte Deletion der PR\* und ERT2 Domäne, die gemeinsam von FRT RTs flankiert vorliegen, in das konstitutiv aktive Cre-FRT-NLS Konstrukt (unten) umgeschaltet werden.

### 2.1.2 Bifunktionales Cre Expressionskonstrukt mit einer ERT2 Domäne (konstitutiv aktiv zu regulierbar)

Im Allgemeinen erfolgt die konditionale Mutagenese *in vivo* in erster Linie mit konstitutiv aktiven Cre Rekombinationssystemen. Ist für die Untersuchung der Genfunktion darüber hinaus eine zeitspezifisch regulierbare Rekombinase Aktivität notwendig, werden Mäuse, die das konditionale Allel enthalten, nachträglich mit einer entsprechenden transgenen Hormon abhängigen Cre Mauslinie verpaart. Auf Grund dessen wurde im Zuge der vorliegenden Arbeit ein bifunktionales Konstrukt entwickelt, das eine konstitutiv aktive Cre Rekombinaseform exprimiert, die durch FLP vermittelte Rekombination in eine Liganden induzierbare Variante überführt werden kann. Um eine solche Modifikation zu bewirken, muss in dieser Ausführung der bifunktionalen Kassette zwischen der Cre und ERT2 kodierenden Sequenz ein FRT flankiertes Kernlokalisierungssignal vorhanden sein, damit nach erfolgter Deletion ein neues Leseraster geschaffen wird, das daraufhin für ein induzierbares Fusionsenzym kodiert. Für die Herstellung der letzten bifunktionalen Konstruktvariante wurde der Klonierungsvektor, der die ursprüngliche Cre-FRT-ERT2-FRT Kassette enthält, so mit einem Restriktionsenzym verdaut, dass je der 3'- bzw. der 5'-Bereich der beiden SV40 polyA Signale zusammen mit den dazwischen lokalisierten FRT und NLS Elementen herausgeschnitten werden konnte. Nach erfolgter Religation entstand ein lediglich aus der Cre Sequenz, einem FRT Motiv, der ERT2 Domäne und am 3'-Ende einem SV40 polyA Signal bestehendes Konstruktfragment. Damit das Fragment die Eigenschaften eines bifunktionalen Konstrukts erhält, wurde das Fragment mit den nötigen NLS, SV40 polyA und FRT Sequenzen vervollständigt. Dazu wurde eine neue SV40 polyA Sequenz mittels der *forward* und *reverse* nlssv40pA-P1 bzw. sv40ftr-P2 Oligos (siehe 7.1), deren 5'-Überhänge die NLS bzw. FRT Sequenz beinhalten, aus dem Vektor pGL3-Promoter amplifiziert. Das NLS-SV40pA-FRT Fragment wurde nach Verifizierung der Sequenz stromabwärts der Cre und FRT aber stromaufwärts der ERT2 und SV40 polyA Segmente in korrekter Orientierung in den bestehenden ORF ligiert. Das vollständige Konstrukt exprimiert die konstitutiv aktive Cre-FRT-NLS Rekombinase Sequenz, deren Transkriptionstermination am SV40 polyA Signal erfolgt. Nach einer FLP vermittelten Deletion der FRT flankierten NLS-SV40 polyA Region, entsteht ein für die Liganden induzierbare Cre-FRT-ERT2 Rekombinase kodierendes Konstrukt. Die Zusammenstellung des von einer konstitutiv aktiven in eine induzierbare Form umschaltbaren bifunktionalen Cre Expressionskonstrukts ist in Abbildung 2.1.5 gezeigt.



**Abb. 2.1.5: Funktionswechsel des bifunktionalen Cre-FRT-NLS-FRT Konstrukts**

Das konstitutiv aktive Cre-FRT-NLS-FRT Konstrukt (oben) kann durch FLP vermittelte Deletion der FRT flankierten NLS Region in das induzierbare Cre-FRT-ERT2 Konstrukt (unten) umgeschaltet werden.

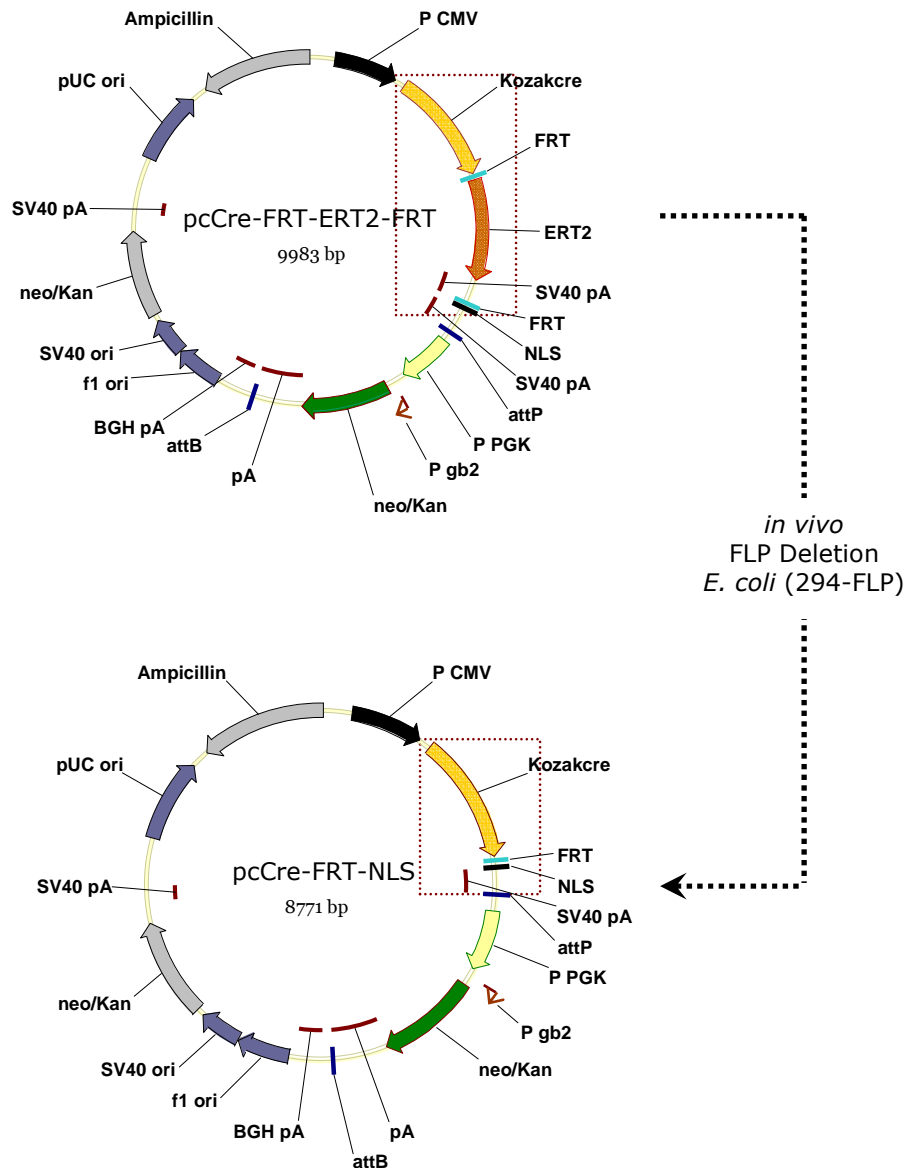
Alle beschriebenen bifunktionalen Konstrukte wurden nach ihrer Fertigstellung aus dem entsprechenden Klonierungsvektor isoliert und in den eukaryotischen pcDNA 3.1 Expressionsvektor subkloniert, um eine transiente Expression der jeweiligen Cre Fusionsrekombinase *in vitro* zu ermöglichen.

### 2.1.3 Untersuchung der Funktionalität der Rekombinase Zielsequenzen

Zur Verifizierung der *in vivo* Funktionalität der FRT Erkennungssequenzen für die FLP Rekombination und zur Herstellung eines korrespondierenden Plasmids, von dem aufgrund der erfolgten Deletion flankierter Regionen eine veränderte Cre Rekombinaseform exprimiert wird, wurden die entwickelten Expressionsplasmide, die für die modifizierten bifunktionalen Cre Expressionskonstrukte kodieren in einen FLP exprimierenden *E. coli* Stamm (294-FLP) [155] transformiert. Die Herstellung eines induzierbaren und des entsprechenden aus einer Transformation in 294-FLP *E. coli* Bakterien resultierenden konstitutiv aktiven Cre Expressionsplasmids, im Fall der Cre-FRT-NLS-FRT Kasette umgekehrt, ist notwendig, um die unabhängige Rekombinationseffizienz beider Fusionsproteine *in vitro* in einem geeigneten Testsystem zu untersuchen [110].

Exemplarisch ist in der unteren Abbildung 2.1.6 der ursprüngliche Liganden induzierbare pcCre-FRT-ERT2-FRT Expressionsvektor und das aus seiner Transformation in 294-FLP Bakterien resultierende konstitutiv aktive pcCre-FRT-NLS Expressionsplasmid mit allen Komponenten des entsprechenden Konstrukts und des pcDNA 3.1 Vektors dargestellt. Der Bereich, in dem sich die erzeugten Cre Expressionsplasmide voneinander unterscheiden, ist durch einen Rahmen gekennzeichnet. Dass die bifunktionale induzierbare Cre-FRT-ERT2-FRT Expressionskasette in eine konstitutiv aktive

Cre-FRT-NLS Form umgeschaltet werden kann und dass beide Cre Fusionsrekombinasen effizient eine Rekombination an loxP Zielsequenzen vermitteln, konnte bereits zuvor in einem initialen Experiment gezeigt werden [152].

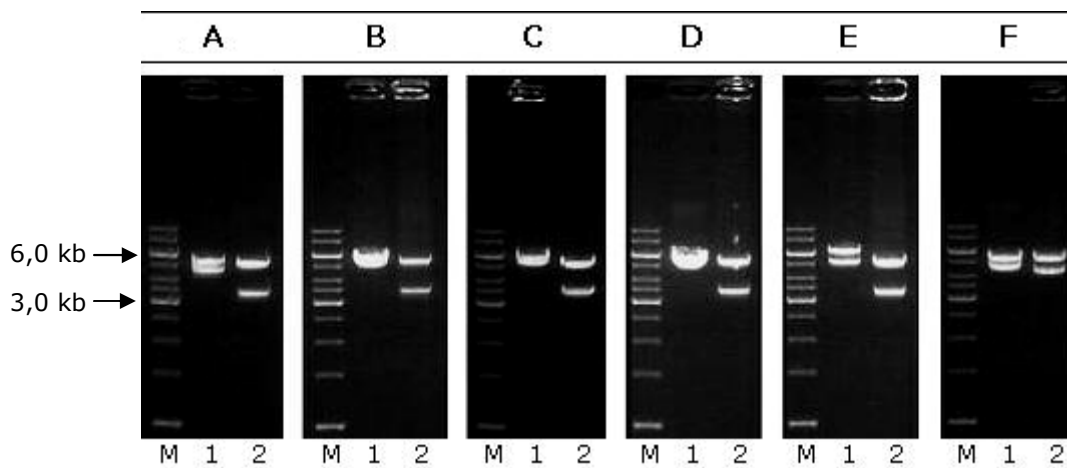


**Abb. 2.1.6: Die Expressionsvektoren pcCre-FRT-ERT2 und pcCre-FRT-NLS**

Aus dem pcCre-FRT-ERT2-FRT Expressionsvektor (oben), der die Expressionskassette für die induzierbare Cre Rekombinase (eingetragter Bereich) enthält, kann durch FLP vermittelte Deletion der FRT flankierten ERT2 Domäne nach Transformation in 294-FLP Bakterien der pcCre-FRT-NLS Expressionsvektor (unten), der die Expressionskassette für die konstitutiv aktive Cre Rekombinase (eingetragter Bereich) enthält, hergestellt werden. Alle Bestandteile der Vektoren sind mit aufgeführt.

Zur Kontrolle, ob die mit Zielsequenzen flankierten Bereiche der transformierten Vektoren tatsächlich deletiert worden sind, wurden Restriktionsverdauanalysen von jeweils mehreren aus 294-FLP Bakterien isolierten Plasmid DNAs durchgeführt. Dazu wurden alle Plasmid DNAs mit der *PmeI* Restriktionsendonuklease, deren spezifische DNA Basensequenz die Cre kodierenden Konstrukte flankiert, inkubiert und elektrophoretisch aufgetrennt. Anhand der Fragmentgrößen konnten die Transformanten identifiziert

werden, in denen ein effizienter Deletionsprozess stattgefunden hat. Die Plasmide pcCre-FRT-2xERT2-FRT und pcCre-FRT-3xERT2-FRT kodieren für ein Liganden induzierbares Cre Protein. Nach der Transformation in 294-FLP Zellen ergaben beide aufgrund der Deletion der FRT flankierten zwei bzw. drei ERT2 Domänen jeweils ein Plasmid, das mit der Sequenz des für die konstitutiv aktive Cre-FRT-NLS Fusionsrekombinase kodierenden pcCre-FRT-NLS Expressionsvektors übereinstimmt. Der die doppelt fusionierte Cre Rekombinase exprimierende pcF5-ERT2-Cre-ERT2-FRT Vektor konnte durch eine FLP vermittelte Deletion der F5 und FRT flankierten ERT2 Domänen in Bakterien in das konstitutiv aktive pcF5-Cre-FRT-NLS Expressionsplasmid umgeschaltet werden. Nach der Transformation des pcCre-FRT-PR-ERT2-FRT Expressionsvektors in den 294-FLP *E. coli* Stamm wurde wiederum das bereits beschriebene pcCre-FRT-NLS Plasmid generiert, das für die konstitutiv aktive Cre-FRT-NLS Variante kodiert. Zuletzt erhielt man aus der Transformation des pcCre-FRT-NLS-FRT konstitutiv aktiven Expressionsplasmiids nach der Deletion des NLS Elements den induzierbaren pcCre-FRT-ERT2 Vektor. Zu Demonstrationszwecken wurde von jedem erzeugten bifunktionalen Cre Expressionsplasmid (A)-(F) die ursprüngliche (1) und die korrespondierende durch FLP vermittelte Deletion modifizierte Variante (2) verdaut und gelelektrophoretisch aufgetrennt.

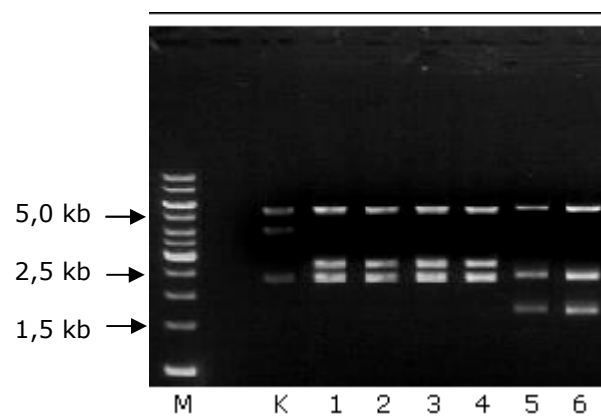


**Abb. 2.1.7: Gelelektrophoretische Auftrennung der Cre Expressionsvektoren**

*PmeI* Verdauere der Cre Expressionsvektoren ergeben den 5326 bp pcDNA Vektorrest und ein der Cre Kasette entsprechendes Fragment. Die Fragmentgrößen sind für (A)1:pcCre-FRT-ERT2-FRT 4657 bp; (B)1:pcCre-FRT-2xERT2-FRT 5587bp; (C)1:pcCre-FRT-3xERT2-FRT 6517 bp; (D)1:pcF5-ERT2-Cre-ERT2-FRT 5683 bp; (E)1:pcCre-FRT-PR-ERT2-FRT 5380 bp; (F)1:pcCre-FRT-NLS-FRT 4660 bp und (A)-(C),(E)2:pcCre-FRT-NLS 3445 bp; (D)2:pcF5-Cre-FRT-NLS 3449 bp; (F)2:pcCre-FRT-ERT2 4357 bp. Die 6,0 kb und 3,0 kb Banden des DNA Markers (M) sind durch Pfeile gekennzeichnet.

Das in Abbildung 2.1.7 gezeigte Ergebnis aus Restriktionsanalysen belegt durch die FLP Rekombinase vermittelte Deletion FRT bzw. F5 flankierter DNA Moleküle die Funktionalität der Erkennungssequenzen.

Während die FLP vermittelte Deletion der FRT flankierten Regionen in den isolierten und analysierten Plasmiden vollständig war, konnte beobachtet werden, dass die zeitgleiche Rekombination an FRT und F5 Motiven, die in einem DNA Molekül je eine Region flankieren, nicht mit der gleichen Effizienz erfolgte. Im überwiegenden Anteil der isolierten potenziellen pcF5-Cre-FRT-NLS Plasmide hat lediglich die Deletion der F5 flankierten Domäne stattgefunden. In der unten aufgeführten Abbildung 2.1.8 wird anhand der erhaltenen Bandenmuster nach durchgeführten Restriktionsspaltungen von Plasmid DNAs deutlich, dass nur in 1/3 der analysierten Plasmide, die aus der Transformation des pcF5-ERT2-Cre-ERT2-FRT Expressionsvektors in 294-FLP Bakterien hervorgegangen sind, sowohl die FRT als auch die F5 flankierten ERT2 Domänen deletiert worden sind.



**Abb. 2.1.8: Gelelektrophoretische Auftrennung des pcF5-ERT2-Cre-ERT2-FRT Plasmids und der potenziellen pcF5-Cre-FRT-NLS Expressionsvektoren**

*EcoRI/NdeI* Doppelverdau des pcF5-ERT2-Cre-ERT2-FRT Vektors (K) vor der FLP vermittelten Deletion der ERT2 Domänen ergeben die 4974 bp, 3776 bp, 2259 bp Fragmente. Die Spuren 1-6 zeigen die Ergebnisse aus dem *EcoRI/NdeI* Doppelverdau von Plasmid DNAs aus der Transformation in 294-FLP Bakterien. In 1-4 sind 4974 bp, 2804 bp, 2259 bp Fragmente zu erkennen, die auf eine Deletion der F5 flankierten Region hinweisen. In 5-6 sind 4974 bp, 2259 bp, 1592 bp Fragmente zu sehen, die nach der Deletion beider ERT2 Domänen entstehen. Die in Spur 5 und 6 aufgetrennten Plasmide entsprechen dem erwarteten pcF5-Cre-FRT-NLS Expressionsvektor. Die 5,0 kb und 2,5 kb und 1,5 kb Banden des DNA Markers (M) sind durch Pfeile gekennzeichnet.

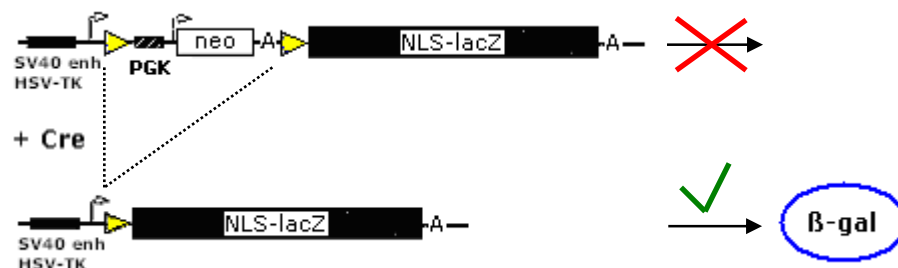
Plasmide, in denen nur die FRT flankierte Region deletiert wurde, wodurch Fragmente von 4974 bp, 2570 bp und 2259 bp entstanden wären, konnten nicht identifiziert werden. Restriktionsanalysen von Plasmid DNAs aus einer Transformation des pcF5-ERT2-Cre-ERT2-FRT Vektors in 294-FLP Zellen mit einer kurzen Inkubation der Bakterien in Flüssigkultur, um eine partielle Rekombination auszulösen bestätigten, dass die Deletion der kürzeren F5 flankierten ERT2 Region bevorzugt eintritt.

Anhand der aufgeführten Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass die bifunktionalen Cre Konstrukte von der Expression eines induzierbaren bzw. konstitutiv aktiven Fusionsproteins auf die Expression einer konstitutiv aktiven bzw. induzierbaren Form *in vivo* durch FLP vermittelte Rekombination umgeschaltet werden können.

Zur Untersuchung der Funktionalität der einzelnen generierten Fusionsrekombinasen wurde jeweils ein induzierbarer und konstitutiv aktiver Cre Expressionsvektor ausgewählt und in transienten Transfektionen auf seine Cre Rekombinationseffizienz untersucht.

#### 2.1.4 Funktionsanalysen der induzierbaren und konstitutiv aktiven Cre Fusionsrekombinasen

Zur Kontrolle, ob die bifunktionalen Konstrukte zur Herstellung transgener Mäuse geeignet sind, in denen von der Expression einer Cre Variante auf die Expression einer anderen Cre Form *in vivo* mittels sequenzspezifischer Rekombinationssysteme umgeschaltet werden kann, musste die Funktionalität der einzelnen Cre Fusionsproteine *in vitro* nachgewiesen werden. Als System für Expressionsanalysen der Fusionsrekombinasen wurde die CV1-B5 Zelllinie ausgewählt [110]. Diese Zelllinie enthält ein Reporter-gen Konstrukt bestehend aus dem ORF des *E. coli lacZ* Gens mit einer NLS Sequenz, wobei der Reporter durch eine *neo* Resistenzkassette von dem Promotor getrennt wird. Ein SV40 polyA Signal stromabwärts vom *neo* ORF verhindert die Transkription des  $\beta$ -Galaktosidase ( $\beta$ -gal) Gens. Cre vermittelte Rekombination zwischen zwei loxP Sequenzen, die die *neo* Kassette flankieren, führt zur Deletion der Resistenzkassette und zur anschließenden Expression des  $\beta$ -gal Reporterproteins. Die Methode, mit der die Funktion der Cre Fusionsproteine analysiert werden kann, ist in Abbildung 2.1.9 anhand des Aktivitätszustandes der Reporter-gen Konstrukte in CV1-B5 Zellen vor und nach Cre vermittelter Deletion der Resistenzkassette verdeutlicht.



**Abb. 2.1.9: Funktionsweise des Reporter-gen Konstrukts in der CV1-B5 Zelllinie.**

Das Markerprotein ( $\beta$ -Galaktosidase) kann von dem NLS-lacZ Konstrukt nicht exprimiert werden, da die kodierende Sequenz von dem Promotor durch eine loxP flankierte *neo* Resistenzkassette getrennt wird (oben). Nach Cre Rekombinase vermittelter Deletion der *neo* Kassette kann das  $\beta$ -Galaktosidase Protein exprimiert werden. SV40 enh HSV-Tk, Fusion aus SV40 *early enhancer* mit -105 HSV-1 Tk Promotor; gelbe Dreiecke, loxP Motive; PGK, Phosphoglycerat Kinase Promotor; neo, Neomycinresistenzgen; A, SV40 polyA Signal, NLS-lacZ, Fusion aus NLS und *lacZ* kodierender Sequenz;  $\beta$ -gal,  $\beta$ -Galaktosidase Protein (verändert aus [110]).

Andere zur Herstellung von Reporter-gen Zelllinien verwendete Gene kodieren für die *firefly* Luciferase (*luc*) oder das *enhanced green fluorescent protein* (eGFP) [156, 157].



Die  $\beta$ -Galaktosidase ist ein leicht nachweisbarer Marker und kann in Zelllysaten mittels Spektrophotometrie quantifiziert werden. Die Expression des Reportergens nach der Rekombination reflektiert die Aktivität eines Cre Proteins.

#### **2.1.4.1 Bestimmung der Cre Aktivität mittels lacZ Färbung**

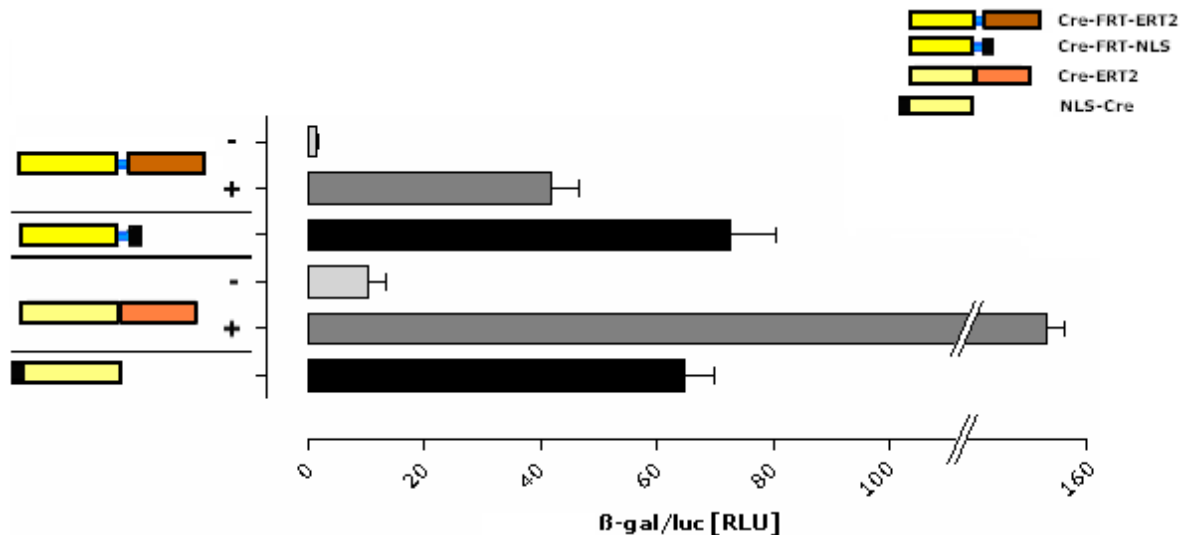
In einem initialen Experiment, wie es zuvor mit dem induzierbaren pcCre-FRT-ERT2-FRT und dem korrespondierenden konstitutiv aktiven pcCre-FRT-NLS Expressionsplasmid erfolgt ist [152], sollte vorab überprüft werden, ob das jeweilige von jedem neu entwickelten Expressionsvektor und seiner mittels FLP Deletion modifizierten Plasmidvariante kodierte Cre Fusionsprotein aktiv ist. Dazu wurden die Liganden induzierbaren und konstitutiv aktiven Cre Expressionsplasmide in CV1-B5 Reportergenzellen transient transfiziert. Als Positivkontrolle für die konstitutiv aktiven bzw. für die Hormon abhängigen Cre Vektoren dienten die konventionellen pBKEF-NLSCre bzw. pNNCre19-ER288-594 Expressionsplasmide, als Negativkontrolle wurden nicht transfizierte CV1-B5 Zellen verwendet. An dieser Stelle muss darauf hingewiesen werden, dass der konstitutiv aktive und der induzierbare Kontrollvektor völlig unabhängig voneinander in zwei unterschiedlichen Experimenten generiert worden sind. Zwölf Stunden nach der transienten Transfektion der Reportergen Zellen wurden die Liganden abhängigen Cre Fusionsproteine durch die Zugabe von 1  $\mu$ M 4-OHT zum Kulturmedium induziert. Für die Induktion der Cre-FRT-PR-ERT2 Fusionsrekombinase wurden zusätzlich 100 nM RU486 hinzugefügt. Um festzustellen, ob die Hormon abhängigen Konstrukte im nicht induzierten Zustand eine Rekombination an loxP Sequenzen vermitteln, wurden die mit induzierbaren Cre Plasmiden transient transfizierten Zellen parallel ohne den synthetischen Liganden kultiviert. Nach weiteren 48 h erfolgte eine lacZ Färbung der fixierten CV1-B5 Zellen. Die Anzahl blau gefärbter Zellen spiegelt die Aktivität der Cre Expressionsplasmide wider. Nach einer Abschätzung der Anzahl gefärbter Zellen wurde festgestellt, dass die Cre Aktivität der einzelnen Expressionsplasmide variiert. Auch in einigen Ansätzen ohne den Induktor, die zur Ermittlung der Hintergrundrekombination von Hormon abhängigen Cre Formen dienten, wurden blaue Zellen identifiziert. Die effizienteste Rekombinationsaktivität wurde bei der konstitutiv aktiven Cre-FRT-NLS Fusionsrekombinase und sowie den Positivkontrollen beobachtet. Das Cre-FRT-ERT2 Protein lieferte ebenfalls vergleichbare Zahlen an blau gefärbten Zellen. Die Hormon abhängigen Konstrukte mit multiplen ERT2 Domänen zeigten abhängig von der Anzahl und Lokalisierung der Domänen unterschiedliche Ergebnisse. Während die mit zwei C-terminalen ERT2 Sequenzen fusionierte Cre Rekombinase noch eine gute Aktivität aufwies, konnten nach der Transfektion mit der aus drei ERT2 Domänen bestehenden Fusionsrekombinase wesentlich weniger blau gefärbte

Zellen nachgewiesen werden. Das doppelt fusionierte Liganden induzierbare F5-ERT2-F5-Cre-FRT-ERT2 Fusionsprotein zeigt zwar die geringste Aktivität, aber keinerlei Hintergrundaktivität, weil keine blauen Zelle identifiziert werden konnten. Die korrespondierende konstitutiv aktive Variante war ebenfalls nur geringfügig aktiv. Auch mit der Cre-FRT-PR-ERT2 Proteinvariante konnte nur eine schwache Rekombination erzielt werden. Zuletzt lieferte das bifunktionale Konstrukt, das von der konstitutiv aktiven auf eine Liganden induzierbare Cre Expression umgeschaltet werden kann (konstitutiv aktiv zu regulierbar), ähnliche Ergebnisse wie das vergleichbare bifunktionale Konstrukt, das von der induzierbaren in die konstitutiv aktive Cre Expressionsform umgeschaltet werden kann (regulierbar zu konstitutiv aktiv). Da die Ermittlung von Zellzahlen unpräzise ist, wurde zur quantitativen Bestimmung der Aktivität der Fusionsrekombinasen ein besser geeignetes System etabliert.

#### 2.1.4.2 Bestimmung der Cre Aktivität mit Hilfe des Dual-Light® Systems

Zur Quantifizierung der Aktivität von konstitutiv aktiven und Hormon abhängigen Cre Konstrukten wurde eine auf Lumineszenz basierende Methode etabliert. Zellen der CV1-B5 Reporter Zelllinie, die auch bei diesem *readout* System eingesetzt werden, wurden mit den Cre Expressionsplasmiden transient transfiziert. Der pGL3-Promoter Vektor, der für die *firefly* Luciferase kodiert, wurde co-transfiziert, um als interne Kontrolle zu dienen. Als Positiv- und Negativkontrollen dienten die bereits erwähnten pBKEF-NLSCre bzw. pNNCre19-ER288-594 Expressionsplasmide sowie nicht transfizierte CV1-B5 Zellen. Transfektionen wurden für jedes generierte Cre Expressionsplasmid in dreifacher Ausführung angesetzt. Zwölf Stunden nach der Transfektion erfolgte die Induktion der Liganden abhängigen Fusionsrekombinasen mit 1  $\mu$ M 4-OHT bzw. zusätzlich mit 100 nM RU486. Zur Untersuchung der Hintergrundrekombination wurden transfizierte Zellen ohne synthetische Liganden inkubiert. Nach weiteren zwei Tagen wurden die Zellen für die Quantifizierung der Rekombinaseaktivität mit Hilfe des Dual-Light® Systems eingesetzt [158]. Dieses Reporter-gen Assay System erlaubt den gleichzeitigen Nachweis von *firefly* Luciferase (luc) und  $\beta$ -Galaktosidase ( $\beta$ -gal) im selben Zellextrakt, was eine Normalisierung der Transfektionseffizienz erleichtert. Die Lichtemission beider Enzymreaktionen wird nacheinander in einem Luminometer gemessen. Anhand der ermittelten Lumineszenz, die in *relative light units* (RLU) angegeben wird, wurden die Aktivitäten der Cre Fusionsrekombinasen bestimmt und miteinander verglichen. Die Ergebnisse aus den dazu durchgeführten Analysen sind in den nachfolgenden Abbildungen gezeigt. Die Cre Fusionsproteine, die zur Übersicht in den Abbildungen dienen sollen, sind in einer vereinfachten Form dargestellt.

Um die Aktivität der induzierbaren und konstitutiv aktiven Proteinform des bifunktionalen Cre Expressionskonstrukts zu ermitteln, wurde für die jeweilige analysierte Variante das Verhältnis von gemessener *firefly* Luciferase zu  $\beta$ -Galaktosidase Lumineszenz kalkuliert und im Vergleich zu den Positivkontrollen grafisch dargestellt.

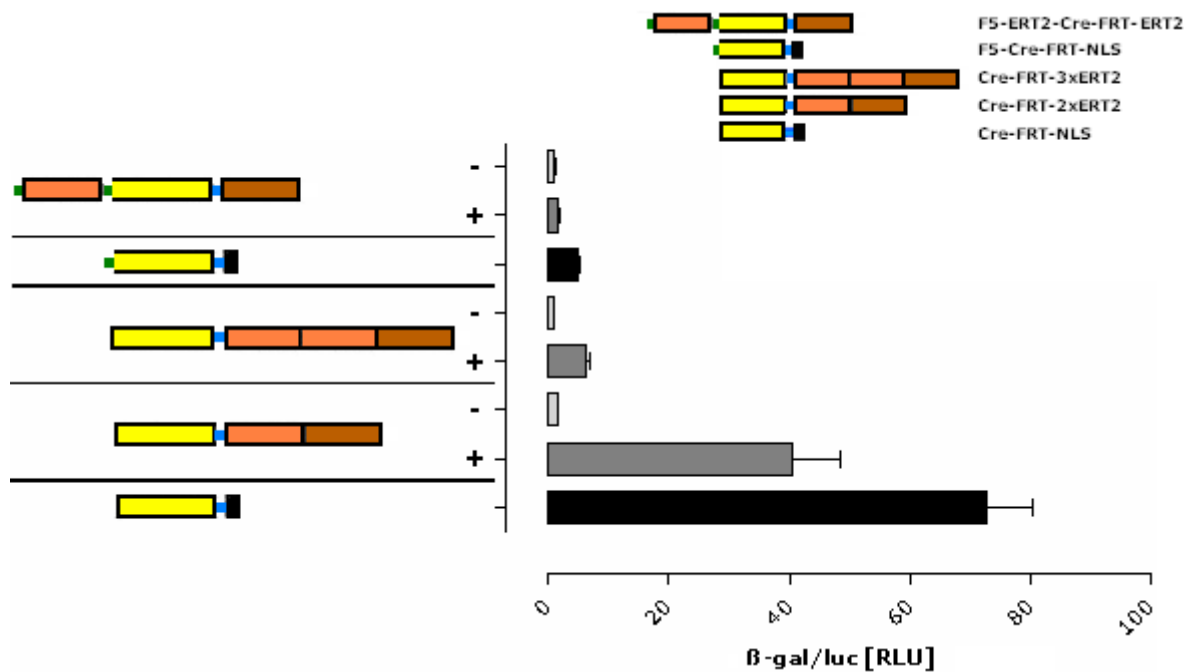


**Abb. 2.1.10: Vergleich der Aktivität der induzierten und nicht induzierten Hormon abhängigen Cre-FRT-ERT2 sowie der korrespondierenden konstitutiv aktiven Cre-FRT-NLS Fusionsrekombinasen mit Cre-ERT2 und NLS-Cre Kontrollproteinen**

Die Aktivität der Cre Fusionsrekombinasen wurde anhand der gemessenen  $\beta$ -Galaktosidase ( $\beta$ -gal) und *firefly* Luciferase Lumineszenz ([RLU] = *relative light units*) in transient transfizierten Reporterzellen bestimmt. (+) steht für eine Induktion und (-) für keine Induktion der Hormon abhängigen Rekombinase mit 4-OHT.

Die konstitutiv aktive Form des bifunktionalen Cre Expressionskonstrukts zeigt eine Rekombinationsaktivität, die mit der Kontrolle vergleichbar ist. Die Aktivität der Hormon abhängigen Cre Form nach Induktion liegt im Vergleich zur konstitutiv aktiven Fusionsrekombinase bei etwa 57 % mit einer ermittelten Hintergrundaktivität von ca. 3,5 %. Die induzierte Liganden abhängige Kontrolle zeigt eine überdurchschnittliche Aktivität, die Aktivität dieser Rekombinase im nicht induzierten Zustand ist jedoch mit fast 7 % doppelt so hoch wie die der Cre-FRT-ERT2 Form.

Zur Feststellung der Aktivität der Hormon abhängigen bifunktionalen Cre Fusionsrekombinasen mit multiplen ERT2 Domänen und der entsprechenden konstitutiv aktiven Fusionsproteine wurden die Ergebnisse aus Lumineszenzmessungen der transfizierten Zellen mit dem jeweiligen Cre Plasmid miteinander verglichen.

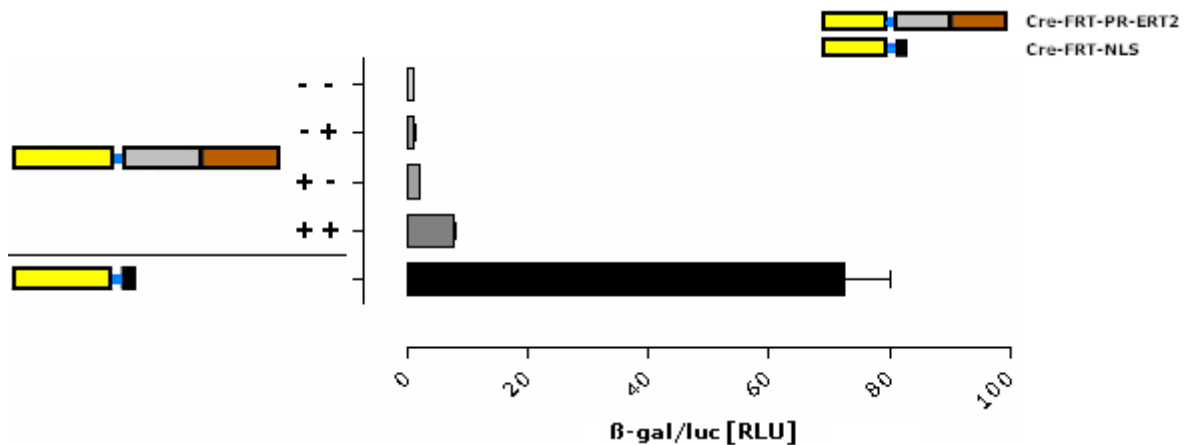


**Abb. 2.1.11: Vergleich der Aktivität der induzierten und nicht induzierten Hormon abhängigen Cre-FRT-2xERT2, Cre-FRT-3xERT2 und F5-ERT2-Cre-FRT-ERT2 sowie der korrespondierenden konstitutiv aktiven Cre-FRT-NLS und F5-Cre-FRT-NLS Fusionsrekombinasen**

Die Aktivität der Cre Fusionsrekombinasen wurde anhand der gemessenen  $\beta$ -Galaktosidase ( $\beta$ -gal) und *firefly* Luciferase Lumineszenz ([RLU] = *relative light units*) in transient transfizierten Reporterzellen bestimmt. (+) steht für eine Induktion und (-) für keine Induktion der Hormon abhängigen Rekombinase mit 4-OHT.

Die Aktivität der induzierten Hormon abhängigen Cre-FRT-2xERT2 Fusionsrekombinase und ihre Hintergrundaktivität mit fast 56 % bzw. ca. 4 % ist vergleichbar mit den erhaltenen Ergebnissen für die Cre-FRT-ERT2 Form. Im Vergleich dazu fällt die Aktivität des induzierten Cre Proteins bestehend aus drei C-terminal fusionierten ERT2 Domänen auf nur noch etwa 8 % ab. Eine Rekombination ohne eine vorherige Induktion mit 4-OHT ist kaum nachweisbar. Das doppelt fusionierte bifunktionale Konstrukt zeigt sowohl in seiner konstitutiv aktiven als auch in der induzierten Form nur eine geringfügige Aktivität. Die Aktivität des F5-Cre-FRT-NLS Enzyms liegt verglichen mit der Kontrolle bei ca. 8 %.

Um die Aktivität der bifunktionalen Rekombinase mit einer PR und ERT2 Domäne zu bestimmen, wurde die Hormon abhängige Cre Form sowohl mit 4-OHT als auch mit RU486 induziert. Zusätzlich erfolgte die Zugabe je nur eines der synthetischen Liganden zu den transfizierten Zellen. Auf diese Weise sollte zusätzlich zu der Hintergrundaktivität die Aktivität detektiert werden, die das Protein aufweist, wenn nur ein Induktor vorliegt.

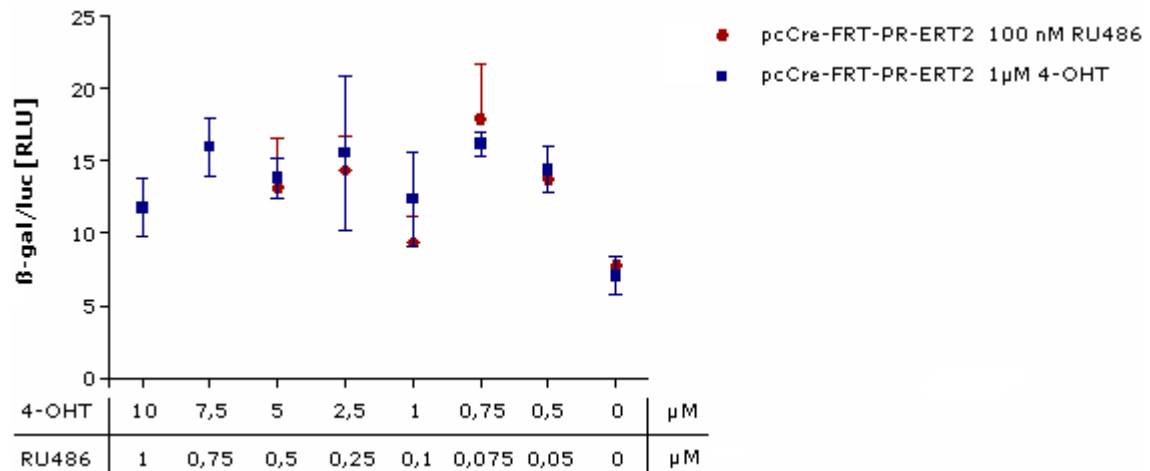


**Abb. 2.1.12: Vergleich der Aktivität des Hormon abhängigen doppelt induzierten, einfach induzierten und nicht induzierten Cre-FRT-PR-ERT2 sowie des korrespondierenden konstitutiv aktiven Cre-FRT-NLS Fusionsrekombinase**

Die Aktivität der Cre Fusionsrekombinasen wurde anhand der gemessenen  $\beta$ -Galaktosidase ( $\beta$ -gal) und *firefly* Luciferase Lumineszenz ([RLU] = *relative light units*) in transient transfizierten Reporterzellen bestimmt. (+ +) steht für eine Induktion mit 4-OHT und RU486, (+ -) für eine Induktion mit 4-OHT, (- +) für eine Induktion mit RU486 und (- -) für keine Induktion des Hormon abhängigen Rekombinase.

Die Aktivität des Cre-FRT-PR-ERT2 Fusionsproteins nach Induktion mit 1  $\mu$ M 4-OHT und 100 nM RU486 (+ +) verglichen mit der Aktivität der konstitutiv aktiven Cre-FRT-NLS Fusionsrekombinase liegt nur bei 10 %. Die Aktivität des Proteins nach 4-OHT (+ -) bzw. RU486 (- +) Induktion ist sehr gering. Eine Aktivität der Rekombinase ohne vorherige Induktion (- -) ist kaum vorhanden.

Um zu ermitteln, ob die Aktivität der Cre-FRT-PR-ERT2 Rekombinase unter anderen Bedingungen erhöht werden kann, wurde das Hormon abhängige Fusionsprotein nach transients Transfektion des pcCre-FRT-PR-ERT2-FRT Expressionsplasmids in die Zellen der CV1-B5 Zelllinie mit unterschiedlichen Liganden Konzentrationen induziert. Da eine Aktivierung mit nur einem Liganden nicht möglich ist, wurden zwei Experimente parallel durchgeführt. Im ersten Versuch erfolgte die Induktion der Rekombinase jeweils mit 100 nM RU486 und zusätzlich mit verschiedenen 4-OHT Konzentrationen. Im zweiten Versuchsansatz erfolgte je die Zugabe von 1  $\mu$ M 4-OHT und darüber hinaus verschiedenen RU486 Konzentrationen. Für 4-OHT wurden Konzentrationen zwischen 500 nM bis 10  $\mu$ M ausgewählt und bei RU486 von 50 nM bis 1  $\mu$ M. Um eine Restaktivität zu ermitteln, wurde jeweils ein Ansatz ohne die Zugabe eines zweiten Liganden inkubiert. Die erhaltenen Ergebnisse aus Lumineszenzmessungen wurden zum Vergleich in einer Abbildung zusammengefasst.

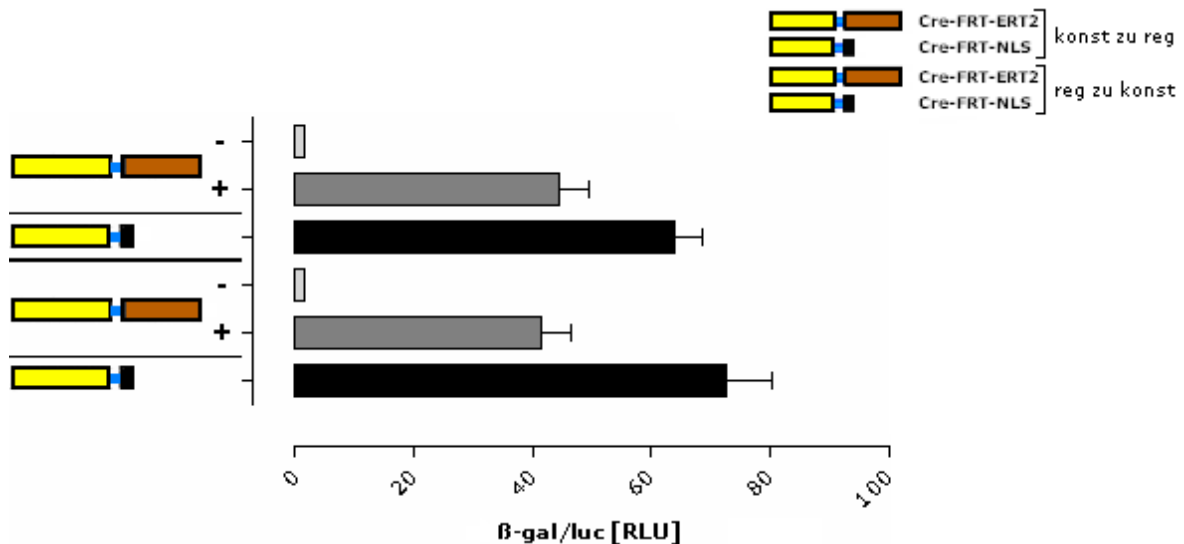


**Abb. 2.1.13: Bestimmung der Aktivität der Cre-FRT-PR-ERT2 Fusionsrekombinase nach Induktion mit verschiedenen Liganden Konzentrationen**

Die Aktivität der Cre-FRT-PR-ERT2 Fusionsrekombinase wurde anhand der gemessenen  $\beta$ -Galaktosidase ( $\beta$ -gal) und *firefly* Luciferase Lumineszenz ([RLU] = *relative light units*) in transient transfizierten Reporterzellen nach Zugabe unterschiedlicher 4-OHT und RU486 Liganden Konzentrationen bestimmt.

Die transfizierten Zellen, denen neben 100 nM RU486 zusätzlich 10  $\mu$ M bzw. 7,5  $\mu$ M 4-OHT hinzugefügt wurde, haben sich vom Boden der Zellkulturschale abgelöst und konnten nicht analysiert werden. Die höchste Aktivität der Cre-FRT-PR-ERT2 Fusionsrekombinase konnte nach Induktion mit 100 nM RU486 und 750 nM 4-OHT bzw. mit 1  $\mu$ M 4-OHT und 75 nM RU486 erzielt werden. Der Mittelwert für das korrespondierende konstitutiv aktive Cre-FRT-NLS Fusionsprotein lag in diesem Experiment bei über 150  $\beta$ -gal/luc [RLU]. Daraus ergibt sich eine Aktivität von etwa 11 % für die Hormon abhängige Rekombinase im Vergleich zur Cre-FRT-NLS Kontrolle.

Zuletzt wurde das bifunktionale Cre Expressionskonstrukt analysiert, das in seiner ursprünglichen Form eine konstitutiv aktive Fusionsrekombinase exprimiert, welche durch FLP vermittelte Deletion der NLS Sequenz in ein Liganden induzierbares Cre Protein umgeschaltet werden kann (konstitutiv aktiv zu regulierbar). Die Aktivität der Konstrukte wurde mit der ursprünglichen bifunktionalen Hormon abhängigen und korrespondierenden konstitutiv aktiven Cre-FRT-ERT2 bzw. Cre-FRT-NLS Fusionsrekombinase (regulierbar zu konstitutiv aktiv) verglichen und in Abbildung 2.1.14 dargestellt.



**Abb. 2.1.14: Vergleich der Aktivität der induzierten und nicht induzierten Hormon abhängigen Cre-FRT-ERT2 sowie der korrespondierenden konstitutiv aktiven Cre-FRT-NLS Fusionsrekombinasen**

Die Aktivität der Cre Fusionsrekombinasen wurde anhand der gemessenen  $\beta$ -Galaktosidase ( $\beta$ -gal) und *firefly* Luciferase Lumineszenz ([RLU] = *relative light units*) in transient transfizierten Reporterzellen bestimmt. (+) steht für eine Induktion und (-) für keine Induktion der Hormon abhängigen Rekombinase mit 4-OHT. Unten sind die Ergebnisse für die Aktivität der Fusionsrekombinasen dargestellt, die von dem ursprünglichen bifunktionalen Konstrukt exprimiert werden können (regulierbar zu konstitutiv aktiv = reg zu konst) und oben die Ergebnisse für die Aktivität der Fusionsrekombinasen, die von dem neuen bifunktionalen Konstrukt exprimiert werden können (konstitutiv aktiv zu regulierbar = konst zu reg).

Anhand der dargestellten Ergebnisse ist zu erkennen, dass die Aktivität und Hintergrundrekombination der beiden Liganden induzierbaren Cre Fusionsrekombinasen, die aus Cre und einer ERT2 Domäne bestehen, fast gleich ist. Auch die Aktivität der entsprechenden konstitutiv aktiven Cre-FRT-NLS Fusionsproteine ist vergleichbar.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass Fusionen von Cre über ein FRT Motiv mit einer NLS Sequenz am C-Terminus ein Protein bilden, dessen Rekombinationsaktivität mit der von konventionellen NLS-Cre Fusionsproteinen vergleichbar ist. Eine C-terminal mit der Cre Rekombinase mittels einem FRT Peptid fusionierte ERT2 Domäne ist mit 4-OHT induzierbar und zeigt eine vergleichsweise niedrige Hintergrundaktivität. Das Hinzufügen weiterer ERT2 Domänen an den C-Terminus der Cre Sequenz steigert weder die Induzierbarkeit der Fusionsrekombinase noch verringert es merklich ihre Hintergrundaktivität. N- und C-terminale Doppelfusionen von ERT2 Domänen mit Cre reduzieren die Leistung des Fusionsproteins. F5 Erkennungssequenzen am 5'-Ende der Cre kodierenden Sequenz verringern die Rekombinationsaktivität erheblich. Der Einsatz von zwei unterschiedlichen LBDs am C-Terminus der Cre Rekombinase hat ebenfalls keinen positiven Einfluss auf die Induzierbarkeit und Hintergrundaktivität eines Cre-FRT-PR-ERT2 Fusionsproteins.

Die beiden effizientesten bifunktionalen Cre Expressionskonstrukte sind demnach Cre-FRT-ERT2-FRT, das von der induzierbaren in eine konstitutiv aktive Fusionsrekombinase umgeschaltet werden kann (regulierbar zu konstitutiv aktiv), sowie das vergleichbare Cre-FRT-NLS-FRT Konstrukt, das in der ursprünglichen Form eine konstitutiv aktive Rekombinase exprimiert und *in vivo* durch FLP vermittelte Rekombination in eine induzierbare Variante umgeschaltet werden kann (konstitutiv aktiv zu regulierbar). Das bifunktionale Cre-FRT-ERT2-FRT Expressionskonstrukt (regulierbar zu konstitutiv aktiv) wurde ausgewählt, um es zur Herstellung eines BAC Transgens mittels ET Rekombination zu verwenden. Das Transgen soll anschließend zur Generierung von transgenen bifunktionalen Cre Mauslinien eingesetzt werden können. Als Zielgen für die Insertion der bifunktionalen Kassette wurde das murine *Epx* Gen gewählt, das für die eosinophile Peroxidase kodiert.

### 2.1.5 Generierung eines BAC Transgens mittels ET Rekombination

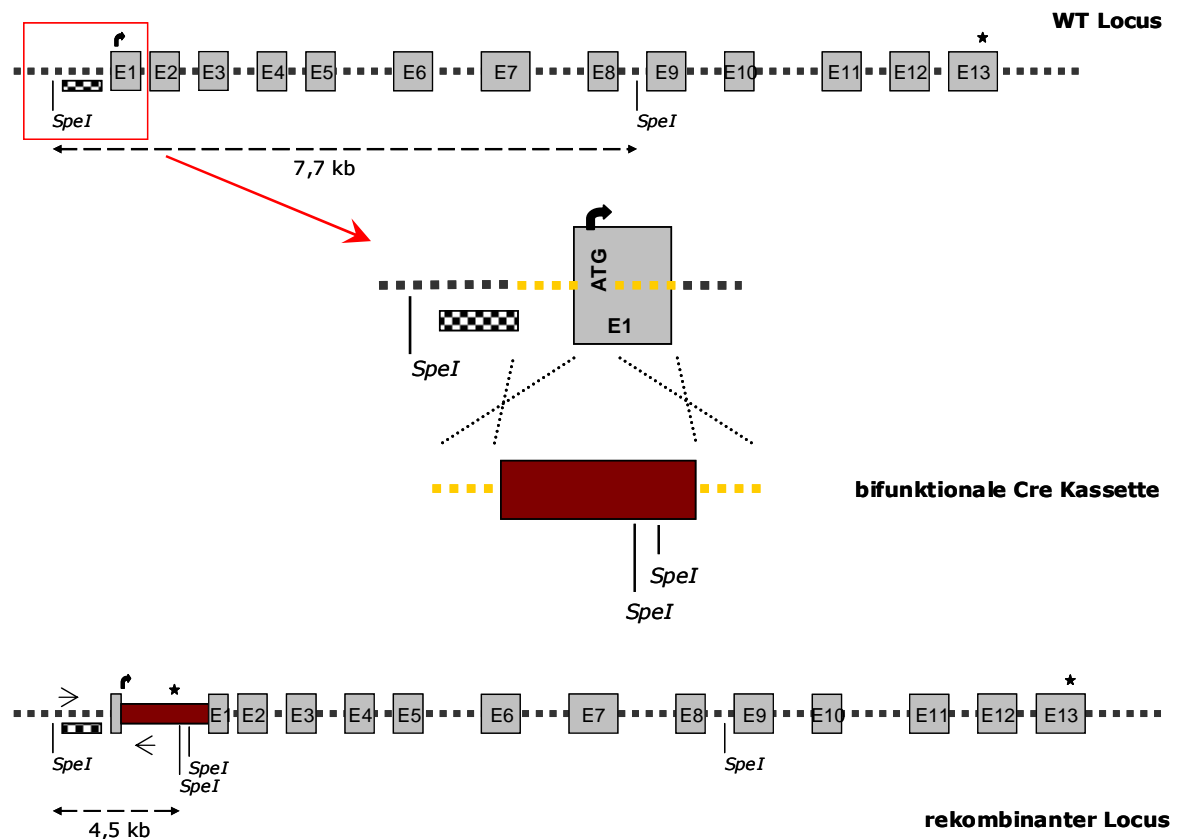
Mit Hilfe der ET Klonierungstechnologie soll ein *Epx* BAC (*bacterial artificial chromosome*) Transgen generiert werden, um anschließend transgene die bifunktionale Cre Rekombinase zelltypspezifisch exprimierende Mauslinien herstellen zu können. Das Gen *Epx*, das für die eosinophile Peroxidase kodiert, wird in Eosinophilen Granulozyten exprimiert und dient als Marker für diesen Zelltyp [159]. Eosinophile gehören zu den Leukozyten und sind an der zellulären Immunabwehr beteiligt, wo sie bei der Abwehr von Parasiten eine Rolle spielen. Der Vorteil beim Einsatz von BACs ist, dass sie meist alle zur Expression des Zielgens nötigen regulatorischen Elemente enthalten [160].

Die ET Klonierungstechnologie, die 1998 von Zhang und Kollegen vorgestellt worden ist, erlaubt die Modifizierung von großen genomischen DNA Fragmenten in *E. coli*, ohne dass Restriktionsenzyme oder DNA Ligasen verwendet werden müssen [161]. Die Technik basiert auf homologer Rekombination zwischen zwei DNA Molekülen mit homologen Sequenzen und wird durch Proteine vermittelt, die ursprünglich aus dem  $\phi$ - oder  $\lambda$  Phagen stammen und für die ET Klonierungsmethode von kommerziell erhältlichen Plasmiden exprimiert werden können.

Das Cre-FRT-ERT2-FRT Konstrukt soll zusammen mit der *neo*/Kan Selektionskassette in das Initiationscodon des aus 13 Exonen bestehenden *Epx* Gens inseriert werden, um *in vivo* eine zelltypspezifische Cre Expression zu ermöglichen. Auf diese Weise kann die Analyse von konditionalen Allelen zu einem gewählten Zeitpunkt sowie begrenzt auf Eosinophile Zellen erfolgen. Aufgrund der mehrfachen Funktion der Rekombinase kann mit der gleichen konditionalen Mausmutante auch nur eine zelltypspezifische Untersuchung des Zielgens durchgeführt werden. Die Strategie für die Insertion der



bifunktionalen Cre Kasette in das *Epx* Gen mittels ET Rekombination ist in Abbildung 2.1.15 vereinfacht schematisch dargestellt.

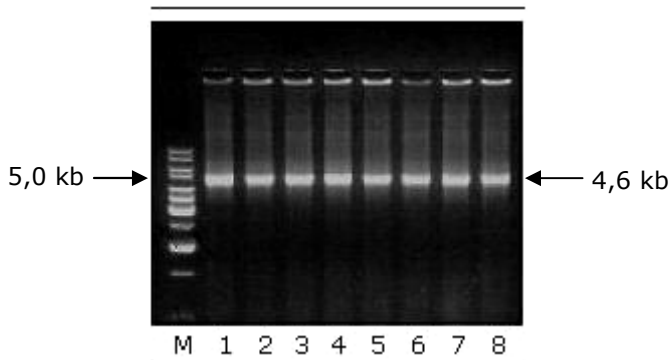


**Abb. 2.1.15: Strategie zur Herstellung eines *Epx* Transgens**

Die bifunktionale Cre Expressionskassette mit dem Selektionsmarker wird mittels homologer Rekombination in Bakterien ins ATG des Exon 1 inseriert, wodurch das Exon in zwei Teile getrennt wird und ein rekombinanter *Epx* Locus entsteht. WT, Wildtyp; E1-E13, Exons; *SpeI*, Restriktionsschnittstelle; gebogener Pfeil, Transkription Initiationsstelle; Stern, Transkription Terminationsstelle; gelbe gestrichelte Linien, homologen Regionen; Pfeile nach rechts und links, Primer zum Nachweis für erfolgreiche Rekombination mit Kolonien-PCR; kariertes Rechteck, Sonde zum Nachweis für erfolgreiche Rekombination mittels Southern Blot.

Für die Modifizierung wurde ein BAC Klon aus der Maus BAC Sammlung RPCI-23 [162] ausgewählt, der die genomische Sequenz des *Epx* Gens enthält. Die ET Rekombination erfolgte in zwei Schritten. Zuerst wurde mittels PCR die Cre-FRT-ERT2-FRT Kasette mit je 80 bp langen flankierenden homologen Regionen zur Insertionsstelle des *Exp* Gens amplifiziert. Dazu wurden die Primer *epxET-P1* und *epxET-P2* (siehe 7.2) verwendet. Um später eine Hintergrundaktivität und dadurch das Auftreten falschpositiver Klone zu vermeiden, wurde die Kasette zuvor in den pMOD™4 Vektor subkloniert. Das Plasmid enthält statt des *colEI ori* (*origin of replication*) den *R6Ky ori*. Die Replikation von dem *ori* ist abhängig vom *pir* Genprodukt. Da die meisten Bakterienstämme, wie auch der *E. coli* Wirtstamm DH10B, der den *Epx* BAC enthält, kein *pir* Gen exprimieren, kann sich die Plasmid DNA nicht replizieren, so dass Hintergrundprobleme eliminiert werden. Das Gelingen der PCR und die Größe der 4.6 kb Fragmente wurde gelelektrophoretisch

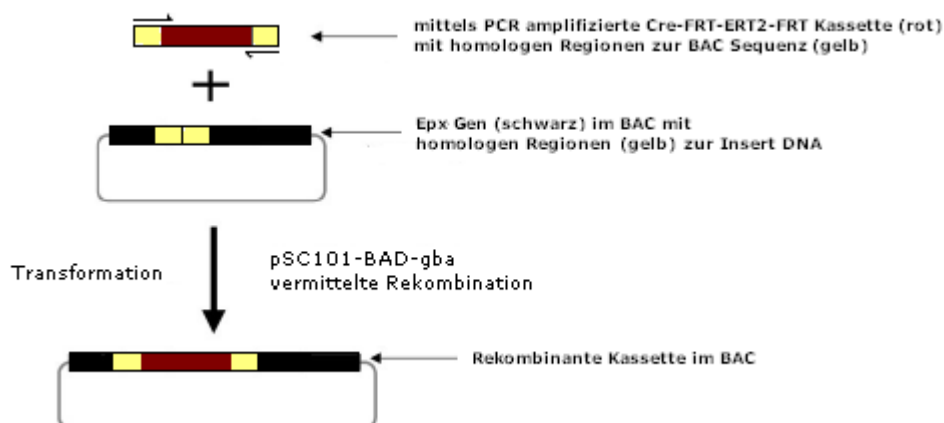
verifiziert (siehe Abbildung 2.1.16) und das aufgereinigte PCR Produkt wurde direkt für die Rekombination in Bakterien eingesetzt.



**Abb. 2.1.16: Gelelektrophoretische Auftrennung von PCR Produkten die für die ET Rekombination dienen sollen**

In den Spuren 1-8 wurden je 5 µl des PCR Produkts aus drei Ansätzen zur Amplifizierung der Cre-FRT-ERT2-FRT Kasette aufgetragen. Die 5,0 kb Bande des DNA Markers (M) und die 4,6 kb Bande des PCR Produkts sind durch Pfeile gekennzeichnet.

Gleichzeitig erfolgte die Elektroporation des pSC101-BAD-gba Plasmids, das für die Rekombinationsproteine kodiert, in den *E. coli* Bakterienstamm mit dem BAC. Im zweiten Schritt wurden die Bakterienzellen, die sowohl den BAC als auch das Rekombinationsplasmid enthalten, mit dem PCR Produkt transformiert, um die Herstellung von rekombinanten Klonen zu erzielen. Die Expression der Rekombinationsgene, die eine homologe Rekombination zwischen der BAC Sequenz und dem PCR Produkt mit homologen Armen vermitteln, erfolgt nach einer Induktion mit L-Arabinose. Da das pSC101-BAD-gba Plasmid einen temperatursensitiven *ori* hat, kann es bei einer Temperatur von über 30°C nicht repliziert werden und wird durch Ausdünnung aus den Bakterien entfernt. Die Schritte zur Generierung eines *Epx* Transgens mittels ET Rekombination sind in Abbildung 2.1.17 vereinfacht zusammengefasst.

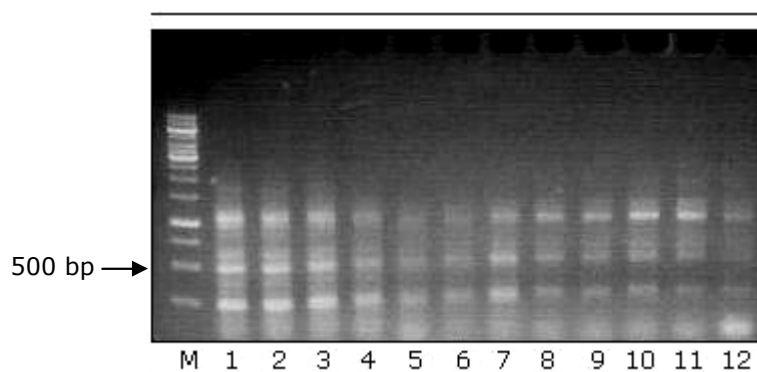


**Abb. 2.1.17: ET Rekombinationsschritte zur Herstellung eines BAC Transgens**

Im ersten Schritt wird die bifunktionale Cre Expressionskassette mittels PCR amplifiziert. Die dazu verwendeten Primer enthalten homologe Bereiche zum *Epx* Gen, dessen genomische Sequenz im BAC vorliegt. Im nächsten Schritt werden die Rekombinationsproteine mittels des pSC101-BAD-gba Expressionsvektors in Bakterienzellen transformiert, die den BAC enthalten. Anschließend erfolgt die Transformation der Cre Kasette in diese Zellen, um einen rekombinanten Klon zu generieren.

Die Detektion von Rekombinanten erfolgte aufgrund der Resistenzkassette, die unter der Kontrolle eines eukaryotischen und eines prokaryotischen Promoters steht, durch eine

Selektion mit Kanamycin, weil der WT BAC nur eine Chloramphenicol Resistenz enthält. Der Test auf homologe Rekombination wurde mittels Kolonien-PCR durchgeführt. Dazu wurden die auf Selektionsplatten gewachsenen Kolonien als PCR Matrize eingesetzt. Mit den Primern epxkol-P1 und epxkol-P2 (siehe 7.2), die in der genomischen Region stromaufwärts von der Insertionsstelle der Kasette bzw. in der Cre Sequenz des Konstrukts binden, sollte ein 500 bp Fragment amplifiziert werden, wenn die Rekombination erfolgreich war. Um das Vorhandensein falschpositiver Klone auszuschließen, wurden in einer zweiten Kontroll-PCR die isolierten Kolonien mit dem Oligo epxkol-P1 und einem weiteren in der genomischen Sequenz bindenden Primer epxkolneg-P2 (siehe 7.2) analysiert. Wenn die Kasette nicht durch homologe Rekombination integriert wurde, sollte ebenfalls ein Produkt von 500 bp entstehen. Obwohl mit der Kontroll-PCR in keinem der fünfzehn isolierten Kanamycin resistenten Klone eine 500 bp Bande nachgewiesen werden konnte, wurde mit der Kolonien-PCR lediglich in einem Klon neben unspezifischen Banden ein schwaches 500 bp Fragment identifiziert. Mit der aus diesem Klon isolierten DNA als Matrize wurde eine Gradienten-PCR von 55-65°C durchgeführt, um das Signal zu verbessern. Das Ergebnis ist in Abbildung 2.1.18 gezeigt.



**Abb. 2.1.18: Gelelektrophoretische Auftrennung der Produkte aus der Gradienten-PCR zur Identifizierung von homolog rekombinierten Klonen**

In Spur 1-12 wurden je 5 µl der Produkte aus der Gradienten-PCR zwischen 55-65°C aufgetragen. Neben des 500 bp Fragments, das als Nachweis für eine homologe Integration der bifunktionalen Cre Kasette in das Exon 1 des *Epx* Gens dient, wurden zusätzliche unspezifische Fragmente amplifiziert. Die 500 bp Bande des DNA Markers (M) ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

Bei jeder Temperatur zwischen 55°C (1) und 65°C (12) wurde neben unspezifischen Fragmenten das 500 bp Fragment amplifiziert, das die homologe Rekombination der bifunktionalen Cre Kasette in das Exon 1 des *Epx* Gens belegt. Um das Ergebnis zu bestätigen, muss der potenzielle transgene *Epx* BAC Klon mittels Southern Blot analysiert werden. Ein Wildtyp Locus ergäbe nach einem *SpeI* Verdau und einer Hybridisierung mit der hergestellten 1 kb DNA Sonde eine 7682 bp Bande, der rekombinante Genlocus aufgrund der zusätzlichen Restriktionsschnittstelle in der bifunktionalen Cre Kasette ein kürzeres 4473 bp Fragment (siehe Abbildung 2.1.15). Sollte in dem BAC Klon die

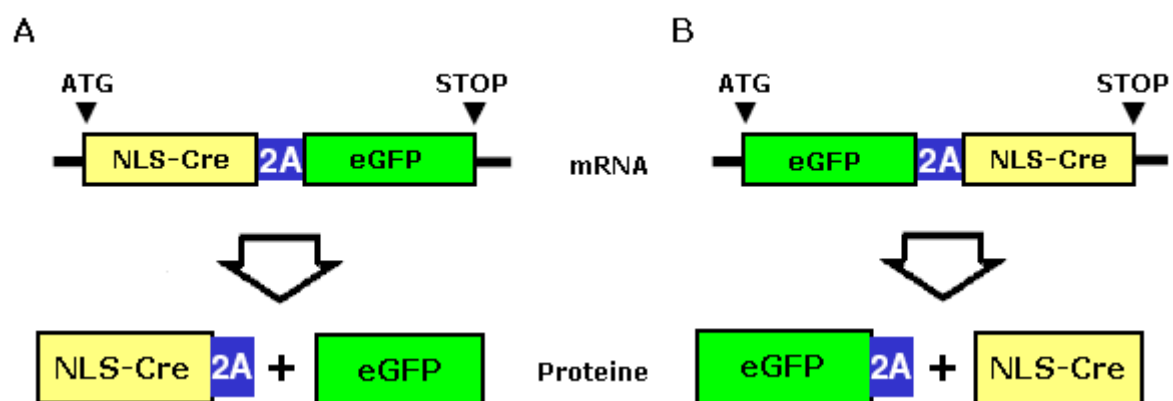
Insertion der bifunktionalen Cre Expressionskassette nachgewiesen werden können, wird das BAC Konstrukt aufgereinigt und für die Herstellung einer transgenen Cre Maus eingesetzt, die in Eosinophilen eine induzierbare Fusionsrekombinase exprimiert. Durch die Verpaarung der Cre Maus mit einer eFLP *deleter* Maus können Nachkommen erhalten werden, die eine konstitutiv aktive Cre Fusionsrekombinase in Eosinophilen exprimieren.

## 2.2 Co-Expression von Genen mittels 2A "CHYSEL" Technologie

Gewebespezifische Cre Expressionskonstrukte lassen sich bisher als Transgene, *knock-ins* oder IRES Konstrukte herstellen. Transgene haben den Nachteil, dass sie unter Umständen nicht alle zur Regulation des entsprechenden Transgens notwendigen Sequenzen enthalten. Dieses Problem kann durch den Einsatz von transgenen BAC Konstrukten meist vermieden werden [160]. Ein weiteres Problem ist, dass durch die Einführung eines transgenen Konstrukts die Expression des endogenen Gens in unerwünschter Weise beeinflusst werden kann [6, 7]. Solche Locus spezifischen negativen Einflüsse lassen sich mittels der *gene targeting* Strategie durch die Verwendung von *knock-in* Konstrukten umgehen, da hier die Expression des Transgens gezielt von dem gewünschten endogenen Locus erfolgt [163-165]. *Knock-in* Konstrukte, mit denen die Insertion der für das Transgen kodierenden DNA Sequenz üblicherweise in das Initiationscodon des endogenen Gens erfolgt, haben allerdings den Nachteil, dass das Zielgen dabei in der Regel inaktiviert wird. Dies kann Gendosis abhängige Phänotypen zur Folge haben oder zu einem kompletten Verlust der Genexpression führen, wenn Gene betroffen sind, die nur in einer Kopie vorliegen. Diesem Problem wiederum kann durch die Verwendung von IRES tragenden Konstrukten vorgebeugt werden [90, 166, 167]. Konstrukte, die ein IRES Element enthalten, haben allerdings den Nachteil, dass die Expression der 3' gelegenen kodierenden Sequenz für gewöhnlich schwächer ist als die der 5'-Sequenz, was dazu führt, dass die Proteine nicht in einem äquimolekularen Verhältnis gebildet werden, sondern dass ein Überschuss des ersten Proteins entsteht. Dies kann zur Folge haben, dass die Expressionsmenge für die Wirksamkeit des Transgens nicht ausreichend ist [92]. Darüber hinaus sind IRES Elemente mit 500 bp relativ lang und transaktivierende oder reprimierende Einflüsse auf die Expression des Ziellocus oder benachbarter Gene können nicht ausgeschlossen werden [93]. Ein neues System erlaubt die koordinierte Co-Expression multipler Proteine in äquimolekularen Mengen von einem einzigen Vektor. Diese Technologie beruht auf einem kleinen 2A Peptid, das während der Translation mit dem Ribosom interagiert und das Ribosom mit der Translation der stromabwärts gelegenen Gene ohne Unterbrechung fortführt. Dieser Sequenztyp wird als "CHYSEL" (*cis-acting hydrolase element*) bezeichnet. Um zwei oder mehrere Gene von einem Plasmid zu co-exprimieren, muss die

2A kodierende Sequenz lediglich in das gleiche Leseraster zwischen diese Gene kloniert werden [93]. Mit Hilfe dieser Technologie konnte eine effektive Co-Expression mehrerer Gene erreicht werden und gleichzeitig eine fast identische Menge der exprimierten Proteine. 2A Peptide bieten gegenüber IRES Sequenzen den Vorteil, dass sie sehr kurz sind und für ihre Wirkung keine erneute Transkriptionsinitiation notwendig ist. Im Vergleich zu herkömmlichen *knock-in* Konstrukten sind solche mit 2A Sequenzen versehenen Konstrukte vorteilhafter, weil der Ziellocus, in den die Insertion erfolgt, nicht inaktiviert wird.

Mittels der 2A "CHYSEL" Technologie wurde ein bicistronisches Plasmid generiert, das für die NLS-Cre Fusionsrekombinase und eGFP (*enhanced green fluorescent protein*) kodiert. Mit diesem System wurde untersucht, ob eine Co-Expression beider Proteine, die in einem Leseraster vorliegen, möglich ist. Außerdem wurde getestet, ob die Cre Expression mit der von konventionellen Cre Expressionsplasmiden vergleichbar ist, um sicherzustellen, dass die Aktivität der Rekombinase durch das Peptid nicht reduziert wird. Ein solches Cre Konstrukt mit "CHYSEL" Sequenz könnte dann beispielsweise für die Herstellung von transgenen Cre exprimierenden Mäusen verwendet werden. Ein möglicher Nachteil von 2A Peptiden könnte die Tatsache sein, dass es am C-Terminus des N-terminalen Proteins verbleibt und möglicherweise die Faltung und die Funktion desselben negativ beeinflusst. Deshalb wurden zwei unterschiedliche Plasmide hergestellt, die entweder das NLS-Cre Protein oder eGFP mit dem 2A Überhang exprimieren, wie in Abbildung 2.2.1 gezeigt.

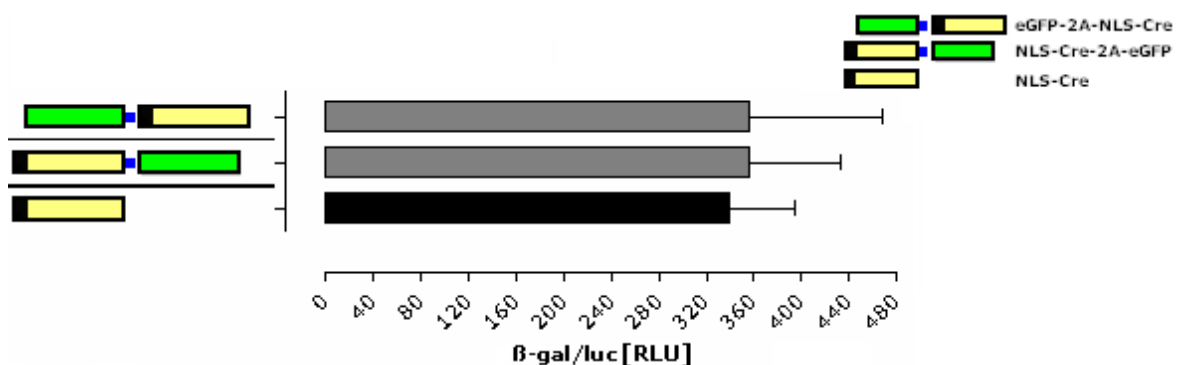


**Abb. 2.2.1: Konstrukte zur Co-Expression von zwei Proteinen**

Konstrukt, das die kodierenden Sequenzen für NLS-Cre und eGFP (A) bzw. in umgekehrter Reihenfolge (B), durch eine 2A Peptid Sequenz miteinander verknüpft sind. Während der Translation der beiden mRNAs wird entweder ein NLS-Cre Protein oder ein eGFP Protein mit einem 2A Peptid Überhang gebildet.

Zur Generierung der bicistronischen Plasmide wurde jeweils die NLS-Cre kodierende Sequenz aus dem pNLS-Cre Plasmid mittels PCR amplifiziert. Die Oligonukleotide cre2A-P1 und -P2 (siehe 7.3), wobei P2 im nicht mit der Matrize bindenden Bereich die 2A Peptid Sequenz enthält, dienten für die Herstellung des NLS-Cre-2A Fragments ohne ein

Stopcodon. Um das entsprechende 2A-NLS-Cre Fragment mit Stopcodon zu erzeugen, wurden die Oligos 2Acre-P1 und -P2 (siehe.7.3) verwendet. In dem Fall enthält der *forward* Primer im Überhang die 2A kodierende Sequenz. Nachdem die Richtigkeit der Sequenz beider Fragmente verifiziert worden ist, wurden sie in das pEGFP-N1 Expressionsplasmid kloniert, das die kodierende Sequenz für eGFP enthält. Damit eine Co-Expression von beiden Proteinen in unterschiedlicher Ausführung möglich ist, wurde das NLS-Cre-2A Fragment stromaufwärts und das 2A-NLS-Cre stromabwärts von der eGFP kodierenden Sequenz in dasselbe Leseraster mittels geeigneter Restriktionsschnittstellen ligiert. Im zweiten Fall wurden die Schnittstellen so gewählt, dass das Stopcodon der EGFP Sequenz entfernt werden konnte, um ein Leseraster zu erzeugen. Die entstandenen Plasmide pNLS-Cre-2A-EGFP und pEGFP-2A-NLS-Cre exprimieren das NLS-Cre Fusionsprotein bzw. den eGFP Marker mit dem 2A Überhang. Beide Expressionsplasmide wurden zum Nachweis, dass jeweils beide Proteine co-exprimiert werden, transient in die CV1-B5 Reportergeren Zelllinie transfiziert. Nach 24 h wurden die transfizierten Zellen aufgeteilt, weitere 24 h kultiviert und anschließend zum Nachweis der Cre Expression lacZ gefärbt. Der Nachweis für die eGFP Expression erfolgte mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops. In beiden Fällen wurden blau gefärbte bzw. grün fluoreszierende Zellen identifiziert, wodurch nachgewiesen werden konnte, dass beide Proteine co-exprimiert werden. Um zu überprüfen, ob die Lokalisierung des 2A Peptids eine Auswirkung auf die Cre Expressioneffizienz hat, wurden die Aktivitäten der jeweiligen Rekombinase mit Hilfe des Dual-Light® Systems ermittelt. Als Positivkontrolle diente der pBKEFNLS-Cre Vektor. Die Ergebnisse aus den Lumineszenzmessungen sind in Abbildung 2.2.2 dargestellt. Die Expressionskonstrukte, die zur Übersicht in den Abbildungen dienen sollen, sind in einer vereinfachten Form dargestellt.



**Abb. 2.2.2: Vergleich der Aktivität der Cre Rekombinase Konstrukte mit und ohne einen 2A Peptid Überhang mit der konventionellen NLS-Cre Form**

Die Aktivität der Cre Expressionskonstrukte wurde anhand der gemessenen  $\beta$ -Galaktosidase ( $\beta$ -gal) und *firefly* Luciferase Lumineszenz ([RLU] = *relative light units*) in transient transfizierten Reportergeren Zellen bestimmt.

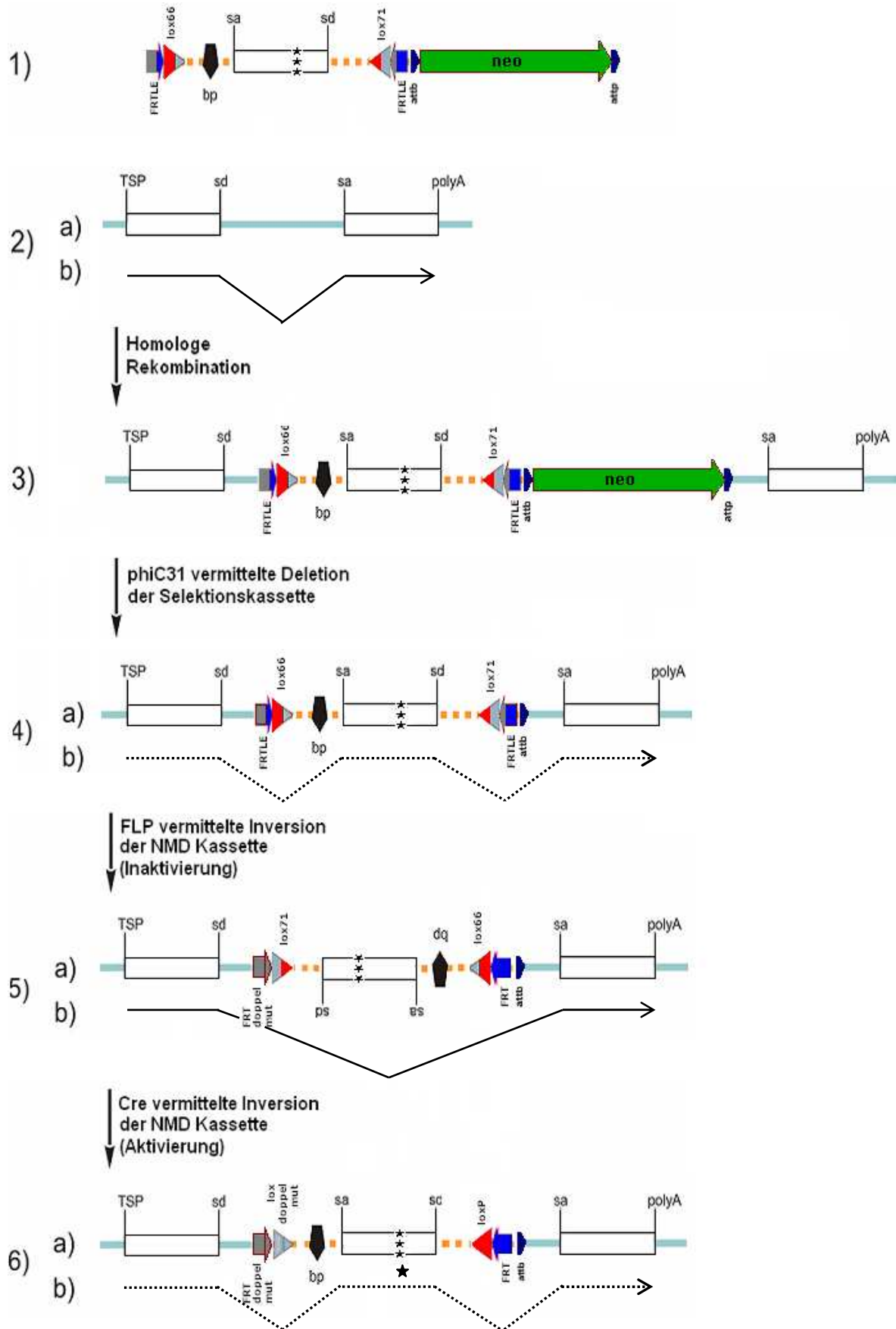
Anhand des Ergebnisses ist zu erkennen, dass beide bicistronischen Plasmide aktive Fusionsrekombinasen exprimieren, die die gleiche Aktivität zeigen wie die Kontrolle, was zeigt, dass ein 2A Peptid am C-Terminus des N-terminalen Proteins die Funktionalität desselben nicht beeinflusst. Demnach können vergleichbare Cre Konstrukte zur Generierung von transgenen Mäusen verwendet werden, wenn eine Co-Expression des endogenen Locus und der Rekombinase nach Insertion des Cre Konstrukts in äquimolekularen Mengen sichergestellt werden soll.

### 2.3 Induzierbare NMD Kassetten zur konditionalen Mutagenese

Die induzierbare NMD Kasette soll ein System darstellen, das beruhend auf einem *nonsense mediated mRNA decay* (NMD) vermittelnden Exon zusammen mit für die Eigenschaften des Exons essentiellen flankierenden Intronsequenzen sowie Rekombinase Erkennungssequenzen eine konditionale Mutagenese eines Gens ermöglicht. Die Inaktivierung der Genaktivität soll erreicht werden, indem ein Primärtranskript so verändert wird, dass es durch den NMD Prozess degradiert wird. Aus der mRNA sollte dann weniger oder möglichst kein Translationsprodukt gebildet werden, so dass die Aktivität des Genprodukts reduziert bzw. eliminiert wird.

#### 2.3.1 Strategie zur Herstellung einer induzierbaren NMD Kasette

Um den NMD Mechanismus zur Geninaktivierung nutzen zu können, muss ein Exon mit einem Stopcodon, das als PTC erkannt wird, in das zu inaktivierende Gen eingeführt werden. Damit eine solche NMD Kasette unabhängig vom ORF des Zielgens verwendet werden kann, muss das Exon in allen drei Leserastern Terminationscodons enthalten. Des Weiteren muss stromaufwärts von den Stopcodons eine *splice acceptor* und mehr als 50-55 nt stromabwärts eine *splice donor site* liegen sowie eine 5'-Intronsequenz mit einem zur Lariatbildung nötigen *branch point*. Eine solche Kasette bildet ein Exon, das wie endogene Exons gespleißt werden kann. Wird eine solche auf NMD basierende Kasette in Transkriptionsrichtung in ein Intron eines beliebigen Gens inseriert, wird eines der Stopcodons als PTC erkannt, wodurch eine Degradierung des Transkripts durch NMD erfolgt. Um eine konditionale Geninaktivierung zu ermöglichen, soll die NMD Kasette mit mutierten loxP und FRT Erkennungssequenzen für Inversionsstrategien in unterschiedlicher Orientierung versehen werden [43, 44]. Außerdem soll die NMD Kasette eine deletierbare Neomycin Resistenzkasette enthalten, die dazu mit attP/attB Erkennungssequenzen für die  $\phi$ C31 Integrase flankiert ist und sowohl in eukaryotischen als auch in prokaryotischen Zellen eine Selektion erlaubt. Die Strategie zur gezielten konditionalen Mutagenese (*gene targeting*) mit Hilfe der induzierbaren NMD Kasette wird anhand der Abbildung 2.3.1 schematisch und schrittweise erläutert.



(Legende auf der folgenden Seite)



**Abb. 2.3.1: Konditionales *gene targeting* mittels einer induzierbaren *nonsense mediated mRNA decay* vermittelnden Kasette**

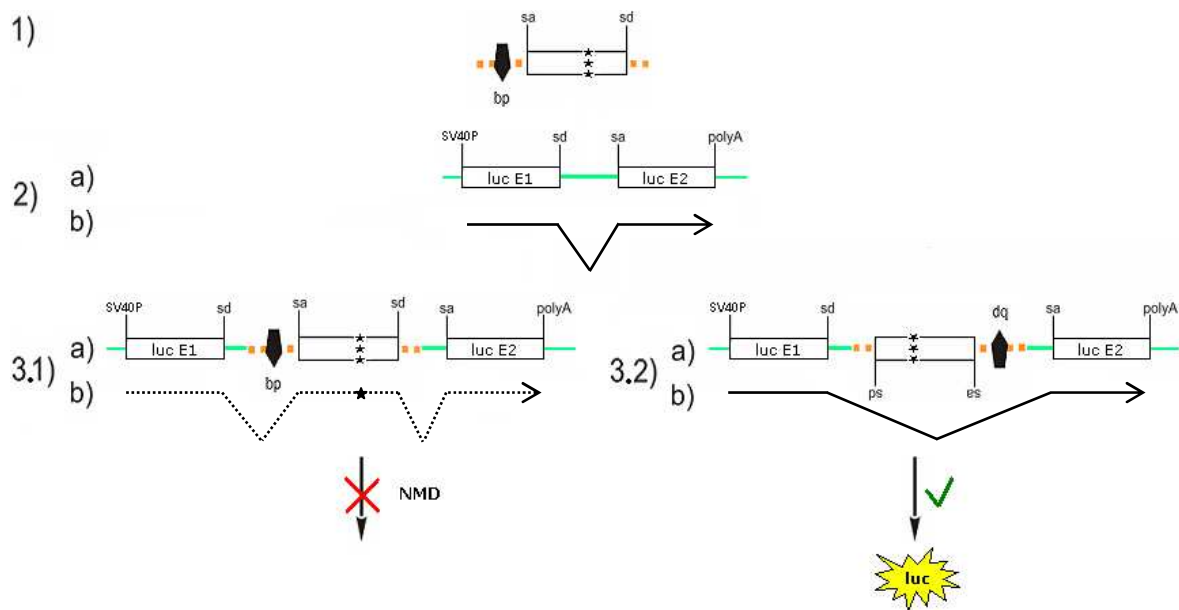
- 1) induzierbare NMD Kasette mit Selektionskasette
  - 2) genomischer Locus mit zwei Exons (a) und entsprechendes Primärtranskript (b)
  - 3) genomischer Locus nach homologer Rekombination der NMD Kasette
  - 4) genomischer Locus mit NMD Kasette nach  $\phi$ C31 vermittelter Deletion der Selektionskasette (a) und PTC markiertes Primärtranskript, das durch *nonsense mediated mRNA decay* degradiert wird (b)
  - 5) genomischer Locus nach FLP vermittelter Inversion und Inaktivierung der NMD Kasette (a) und entsprechendes Primärtranskript (b)
  - 6) genomischer Locus nach Cre vermittelter Inversion und Reaktivierung der NMD Kasette (a) und PTC markiertes Primärtranskript, das durch *nonsense mediated mRNA decay* degradiert wird (b)
- TSP, Transkriptionsstartpunkt; Stern, als PTC dienendes Stopcodon; bp, *branch point*; polyA, Polyadenylierungssignal; sd, *splice donor*; sa, *splice acceptor*.

Mit Hilfe der in die NMD Kasette eingeführten Erkennungssequenzen für die Cre bzw. FLP Rekombinase können zwei gerichtete aufeinander folgende Inversionsreaktionen erzielt werden. Nach homologer Rekombination der NMD Kasette in Transkriptionsrichtung in ein Intron eines Zielgens und anschließender  $\phi$ C31 vermittelter Deletion des Resistenzgens wird eines der Stopcodons als PTC erkannt und das Transkript degradiert. Durch FLP Rekombinase Expression kann die NMD Kasette zwischen den beiden mutierten FRT Sequenzen gedreht werden und liegt dann entgegen der Transkriptionsrichtung im Zielgen vor. Durch das endogene Spleißen wird die Kasette aus dem Primärtranskript entfernt und die normale Expression des konditionalen Allels wiederhergestellt. Eine zweite durch Cre vermittelte Inversion dreht die NMD Kasette wieder zurück in Transkriptionsrichtung, wodurch ihre NMD induzierbare Funktion reaktiviert und das Zielgen inaktiviert wird. Nach der FLP bzw. Cre vermittelten Inversion entsteht jeweils eine doppelt mutierte sowie eine Wildtyp FRT bzw. loxP Erkennungssequenz. Da solche Doppelmutanten nicht mehr von der Cre bzw. FLP Rekombinase erkannt werden, kann die NMD Kasette nicht in die Ausgangsposition zurückgedreht werden [45].

### 2.3.2 System zur Untersuchung der Funktion von induzierbaren NMD Kassetten

Damit NMD Kassetten auf ihre Wirksamkeit untersucht werden können, muss ein Testsystem zur Verfügung stehen, das nach Insertion der Kasette in ein Intron eines Zielgens durch dessen Expressionsstatus anzeigt, ob eine NMD vermittelte Degradierung desselben stattgefunden hat. Für die Herstellung eines geeigneten Systems wurde als das zu inaktivierende Gen das *firefly* Luciferase (*luc*) Reportergen aus *Photinus pyralis* verwendet, das im Vektor pCMVluc-lambdaIn2-m2A durch ein Intron aus dem *lambda2* Gen der Maus in zwei Exons geteilt wird. Die *luc-lambdaIn2* Sequenz wurde zusammen mit dem SV40 polyA Signal durch einen Verdau mit geeigneten Restriktionsenzymen aus dem Plasmid isoliert und in den pGL2-Promoter Vektor, der als Luciferase Reporter Vektor für quantitative Analysen der Genexpression in transfizierten eukaryotischen Zellen

dient, an die Stelle des Wildtyp *luc* Gens kloniert. In die Intronsequenz wurde für weitere Klonierungsreaktionen ein Polylinker (siehe 7.4) ligiert. Die NMD Kasette wurde dann in beiden Orientierungen in das Intron des pGL2luc-lambdaIn2 Luciferase Reporter Gen Vektors eingeführt, so dass das NMD vermittelnde Exon entweder im kodierenden oder im nicht kodierenden Strang vorlag. Das Testsystem ist vereinfacht in Abbildung 2.3.2 gezeigt.



**Abb. 2.3.2: System zur Untersuchung der Wirkung von NMD Kassetten**

1) NMD Kasette

2) aus zwei Exons bestehendes Luciferase Reporter Gen (a) und entsprechendes Primärtranskript (b)

3.1) NMD vermittelndes Exon im gleichen Strang wie die luc Exons (a) und PTC markiertes Primärtranskript, das durch *nonsense mediated mRNA decay* degradiert wird (b), so dass keine Luciferase exprimiert werden kann

3.2) NMD vermittelndes Exon nicht im gleichen Strang wie die luc Exons (a) und entsprechendes Primärtranskript (b), so dass Luciferase exprimiert werden kann

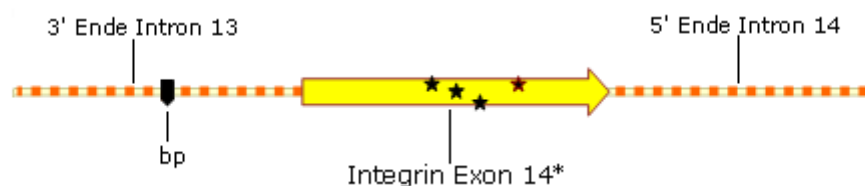
SV40P, Promotor; Stern, als PTC dienendes Stopcodon; bp, branch point; polyA, Polyadenylierungssignal; sd, splice donor; sa, splice acceptor.

Ist die NMD Kasette im gleichen Strang lokalisiert wie die Exons des Luciferase Gens, wird eines der Stopcodons als PTC erkannt und NMD induziert, so dass die mRNA degradiert wird und keine Luciferase exprimiert werden kann. Im anderen Fall wird die Kasette herausgespleißt, so dass kein NMD ausgelöst wird und dadurch Luciferase exprimiert werden kann. Die Luciferase Aktivität und damit die NMD vermittelnde Wirkung der Kasette kann nach erfolgter Transfektion der NMD Vektoren in eine eukaryotische Zelllinie luminometrisch bestimmt werden.

### 2.3.3 $\beta_7$ -Integrin Gen basierende induzierbare NMD Kasette

Mittels gezieltem *gene targeting* wurde in das Exon 14 des  $\beta_7$ -Integrin Gens eine Stopmutation ( $\Delta 61$ ) eingeführt, die zu einer kompletten Deletion der zytoplasmatischen Domäne des Rezeptors führen sollte. Basierend auf genetisch veränderten ES-Zellen konnten Mausmutanten generiert werden, die statt des verkürzten Proteins keine Expression des  $\beta_7$ -Integrins auf der Oberfläche von Lymphozyten zeigen. Da die Mutation 78 nt stromaufwärts der nächsten Exon-Exon Verbindung liegt, wurde angenommen, dass diese als ein PTC erkannt wird und durch den NMD Prozess eine Degradierung der kompletten  $\beta_7$ -Integrin mRNA erfolgt [153].

Folglich wurde die Sequenz des mutierten Exon 14 des  $\beta_7$ -Integrin Gens als Vorlage für die Herstellung einer Kasette mit einem NMD vermittelnden Exon eingesetzt. Damit das Exon unabhängig vom ORF einen NMD Prozess auslösen kann, wurden weitere Stopcodons in die genomische Sequenz eingeführt werden. Dazu wurde die Sequenz des Exon 14 und Teile der 5'- und 3'-Introns ausgehend von dem  $\Delta 61$  *gene targeting* Plasmid, das das Konstrukt zur Einführung der  $\Delta 61$  Punktmutation beinhaltet [153], mittels PCR modifiziert. Zuerst erfolgten zwei unabhängige PCRs mit den Primern itgb7-P1 und itgb7-P2 sowie itgb7-P3 und itgb7-P4 (siehe 7.5), die Modifikationen zur Einführung der zusätzlichen Stopcodons in allen drei Leserastern enthalten, mit denen Fragmente mit überlappenden Sequenzen im Exon14 Bereich amplifiziert worden sind. Diese DNA Fragmente dienten als Matrize in einer dritten PCR mit den flankierenden Primern itgb7-P1 und itgb7-P4 zur Generierung des gesamten Fragments, das die auf  $\beta_7$ -Integrin Exon 14 (itgb7) basierende NMD Kasette bildet, die in Abbildung 2.3.3 schematisch darstellt ist.

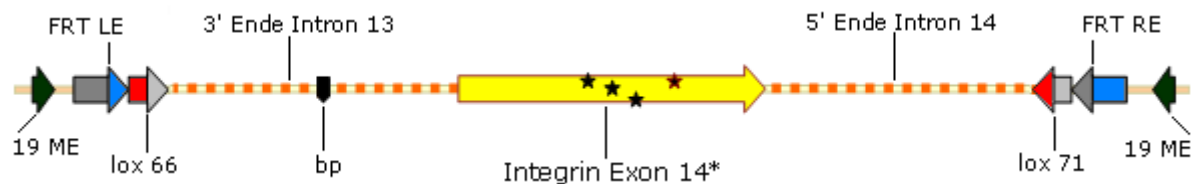


**Abb. 2.3.3: itgb7 NMD Kasette**

Die itgb7 NMD Kasette besteht aus dem  $\beta_7$ -Integrin Exon 14, das mit Stopcodons in allen drei Leserastern modifiziert wurde, um als NMD vermittelndes Exon in der Kasette zu dienen und Teilen der für die Eigenschaften des Exons essentiellen flankierenden Introns. bp, *branch point*; Stern (schwarz), eingeführte Stopcodons in allen drei ORFs; Stern (rot),  $\Delta 61$  Punktmutation.

Um eine konditionale Inaktivierung und Reaktivierung eines Zielgens mittels Inversion der NMD Kasette zu ermöglichen, musste diese mit flankierenden lox66 und lox71 sowie FRT LE und FRT RE Erkennungssequenzen für Cre bzw. für FLP Rekombinase in entgegengesetzter Orientierung versehen werden [43, 44]. Dazu wurde ein DNA Fragment synthetisiert, das die Rekombinase Zielsequenzen in der für ihre Funktionalität

notwendigen Orientierung enthält (siehe 7.6), welches dann an die Stelle der zuvor durch einen Restriktionsverdau entfernten MCS (*multiple cloning site*) in den pPCR-Script Amp SK(+) Vektor kloniert wurde. Das mittels PCR generierte itgb7 NMD Fragment wurde nach Verifizierung der korrekten Sequenz in eine geeignete Schnittstelle des modifizierten Klonierungsvektors ligiert, so dass sie von je einer mutierten loxP und FRT Rekombinase Zielsequenz flankiert vorliegt (siehe Abbildung 2.3.4). Dadurch ist eine Variante der NMD Kasette entstanden, die für konditionale Mutagenese verwendet werden kann.



**Abb. 2.3.4: itgb7-me-frt-lox NMD Kasette zur konditionalen Mutagenese**

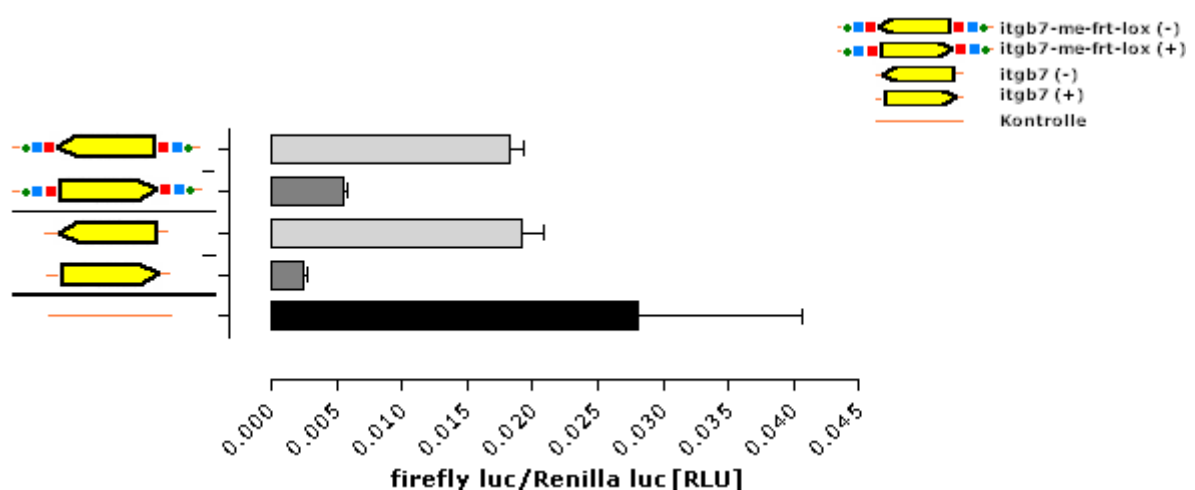
Die itgb7-me-frt-lox NMD Kasette besteht aus dem  $\beta_7$ -Integrin Exon 14, das mit Stopcodons in allen drei Leserastern modifiziert wurde, um als NMD vermittelndes Exon in der Kasette zu dienen und Teilen der für die Eigenschaften des Exons essentiellen flankierenden Introns. Die Kasette wird von mutierten Rekombinase bzw. Transposase Erkennungssequenzen flankiert, um eine Inversion der Kasette zu erzielen. bp, *branch point*; Stern (schwarz), eingeführte Stopcodons in allen drei ORFs; Stern (rot),  $\Delta 61$  Punktmutation.

Die eingeführten 19 ME (19 bp *mosaic end sequence*) Motive sind Erkennungssequenzen für die prokaryotische EZ-TN5 Transposase, um die Kasette *in vitro* als synthetisches Transposon verwenden zu können. Um die 19 ME flankierte NMD Kasette zu mobilisieren, muss sie mit der rekombinanten EZ-Tn5 Transposase inkubiert werden, wobei diese an ihre Erkennungsstellen bindet und so ein Transposom entsteht. Wird ein solches Transposom mit einem Plasmid gemischt, das ein kloniertes genomisches Fragment eines Gens enthält, inseriert es an unterschiedlichen Stellen in den Plasmiden. Liegt die Insertionsstelle im genomischen Fragment eines Plasmids, kann das Plasmid je nach Orientierung der Kasette, direkt für die Herstellung eines konditional inaktivierbaren oder reaktivierbaren Allels in ES-Zellen mittels homologer Rekombination verwendet werden. Auf die Verwendung der induzierbaren NMD Kasette zur Herstellung von *targeting* Vektoren mittels Transposition wird im Zusammenhang mit dieser Arbeit nicht näher eingegangen. Genaue Informationen über dieses System können der eingereichten Patentschrift über die "Entwicklung einer neuen auf NMD basierenden Strategie zur konditionalen Inaktivierung von Genen in der Maus" entnommen werden [168].

### 2.3.3.1 Funktionsanalysen der $\beta_7$ -Integrin Gen basierenden induzierbaren NMD Kassetten

Um die ursprüngliche und die mit Erkennungssequenzen flankierte itgb7 NMD Kasette, die mittels Restriktionsverdau aus dem pPCR-Script Amp SK(+) Vektor isoliert wurde, auf

ihre NMD vermittelnde Wirkung zu untersuchen, wurden beide Kassetten in jeweils beiden Orientierungen in das Intron des hergestellten pGL2luc-lambdaIn2 Reporter-gen Vektors kloniert. Die entstandenen Vektoren pGL2luc-itgb7 (+) und (-) sowie pGL2luc-itgb7-me-frt-lox (+) und (-), wobei (+) das Plasmid mit dem Exon im kodierenden Strang und (-) im nicht kodierenden Strang repräsentiert, wurden anschließend in jeweils drei unabhängigen Reaktionen transient in Zellen der Linie A293 transfiziert. Als Kontrolle diente der Ursprungsvektor pGL2luc-lambdaIn2 ohne NMD Kasette. Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz erfolgte eine Co-Transfektion mit einem Plasmid, das ein *Renilla reniformis* Luciferasegen enthält, dessen Produkt unabhängig von der *firefly* Luciferase gemessen werden kann. Die Bestimmung der Aktivität beider Luciferase Reporter erfolgte luminometrisch mit Hilfe des Dual-Luciferase® Reporter (DLR™) Assay Systems [169]. Das DLR™ System bietet den Vorteil, die Aktivität der *firefly* und *Renilla* Luciferase nacheinander in einem Ansatz messen zu können, wodurch eine schnelle Quantifizierung beider Reporter in transfizierten Zellen möglich ist. 48 h nach der Transfektion der NMD Plasmide wurden die A293 Zellen geerntet, lysiert und auf Luciferase Aktivität untersucht. Durch Ermittlung des Verhältnisses von *firefly* Luciferase Aktivität zur Aktivität der *Renilla* Luciferase anhand der Lumineszenz, die in *relative light units* (RLU) angegeben wird, kann eine Aussage über die Wirksamkeit der jeweiligen itgb7 NMD Kasette gemacht werden. Die Ergebnisse (siehe Abbildung 2.3.5) zeigen den Durchschnitt aus jeweils drei unabhängigen Transfektionsreaktionen. Die NMD Kassetten, die zur Übersicht in den Abbildungen dienen sollen, sind in einer vereinfachten Form dargestellt.



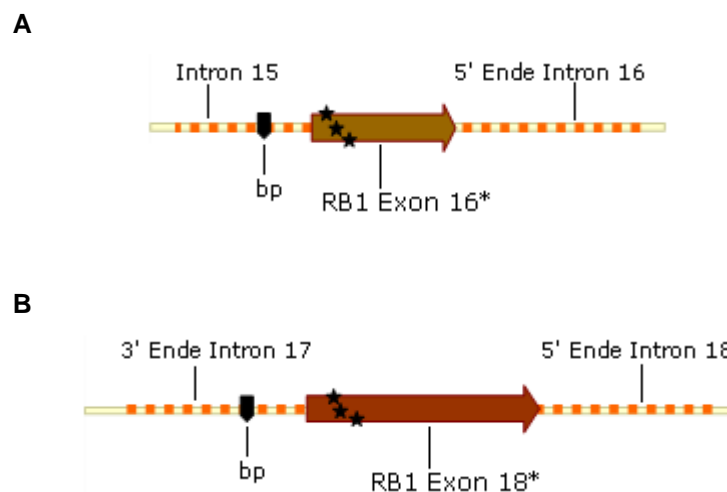
**Abb. 2.3.5: Vergleich der Wirkung der itgb7 und itgb7-me-frt-lox NMD Kassetten auf die Aktivität de Luciferase Reporters**

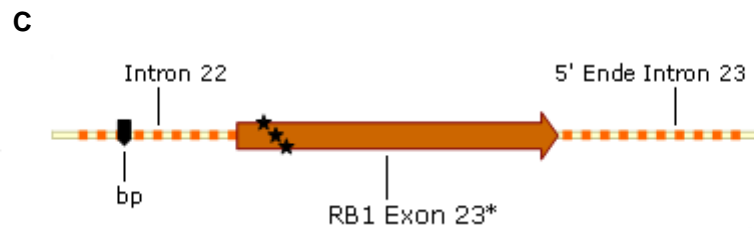
Die Wirkung der NMD Kassetten wurde anhand der gemessenen *firefly* und *Renilla* Luciferase Lumineszenz ([RLU] = *relative light units*), in mit NMD Plasmiden transient transfizierten Zellen bestimmt. Die NMD Plasmide enthalten ein in zwei Exons geteiltes *firefly* Luciferase Reporter-gen, in dessen Intron die jeweilige NMD Kasette kloniert worden ist. (+) bzw. (-) gibt die Orientierung der jeweiligen NMD Kasette zu den Luciferase Exons an, wobei (+) für die Kasette im kodierenden und (-) im nicht kodierenden Strang steht. Als Kontrolle diente die Luciferase Aktivität der Zellen, die mit dem pGL2luc-lambdaIn2 Luciferase Kontrollplasmid, das keine NMD Kasette enthält, transient transfiziert wurden.

Mit den Vektoren, in denen das NMD vermittelnde Exon mit bzw. ohne flankierende Erkennungssequenzen im nicht kodierenden Strang der Luciferase Exons vorliegt, konnte im Vergleich zum Wildtyp Reporter Gen Vektor pGL2luc-lambdaIn2 eine Abnahme der Reporter Gen Aktivität um ein Drittel festgestellt werden. Zellen, die mit dem pGL2luc-itgb7 (+) Plasmid transfiziert worden sind, zeigten verglichen mit der Kontrolle eine Luciferase Restaktivität von ca. 9 %. Die Restaktivität der Luciferase in Zellen, die mit dem pGL2luc-itgb7-me-frt-lox (+) Plasmid transfiziert wurden, liegt verglichen mit der Kontrolle bei 20 %. Die Ergebnisse aus den Analysen der Luciferase Aktivität zeigen, dass das murine  $\beta_7$ -Integrin Gen als Bestandteil von induzierbaren NMD Kassetten zur Inaktivierung von Zielgenen *in vivo* eingesetzt werden kann.

### 2.3.4 Retinoblastom Gen basierende induzierbare NMD Kassetten

Da für die Generierung induzierbarer NMD Kassetten zur konditionalen Mutagenese Exons verwendet werden sollen, die nicht alternativ gespleißt werden, wurde in der Datenbank nach Genen gesucht, für die in Maus und Mensch kein alternatives Spleißen nachgewiesen werden konnte. Drei Exons des humanen Retinoblastom Gens (RB1) wurden für die Herstellung weiterer NMD Kassetten ausgewählt, weil sie keine für die Anwendung als induzierbare NMD Kasette störenden Spleißsignale im nicht kodierenden Strang enthalten. Entsprechend der Vorgehensweise, wie sie bereits für die Generierung des modifizierten Exon 14\* des murinen  $\beta_7$ -Integrin Gens beschrieben wurde, wurden die Exons 16, 18 und 23 mit den flankierenden Intronsequenzen in drei aufeinander folgenden PCR Reaktionen aus der genomischen RB1 DNA amplifiziert. Mit Hilfe von verschiedenen Oligonukleotiden (siehe 7.5) wurden so drei als PTCs dienende Stopcodons mindestens 55 nt stromaufwärts der *splice donor site* in jedes Exon eingeführt. Die NMD vermittelnden Exons der NMD Kassetten sind schematisch in der Abbildung 2.3.6 A-C aufgeführt.





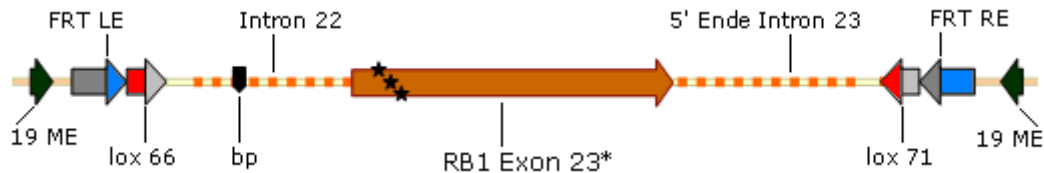
**Abb. 2.3.6: RB1 NMD Kassetten**

(A), RB1-16 NMD Kasette; (B), RB1-18 NMD Kasette; (C) RB1-23 NMD Kasette. Die jeweilige RB1 NMD Kasette besteht aus dem Retinoblastom Exon 16, 18 oder 23, das mit Stopcodons in allen drei Leserastern modifiziert wurde, um als NMD vermittelndes Exon in der Kasette zu dienen und Teilen der für die Eigenschaften des Exons essentiellen flankierenden Introns. bp, *branch point*; Stern, eingeführte Stopcodons in allen drei ORFs.

Die mittels PCR generierten RB1 NMD Kassetten wurden sequenziert und anschließend auf ihre Wirksamkeit getestet.

#### 2.3.4.1 Funktionsanalysen der Retinoblastom Gen basierenden induzierbaren NMD Kassetten

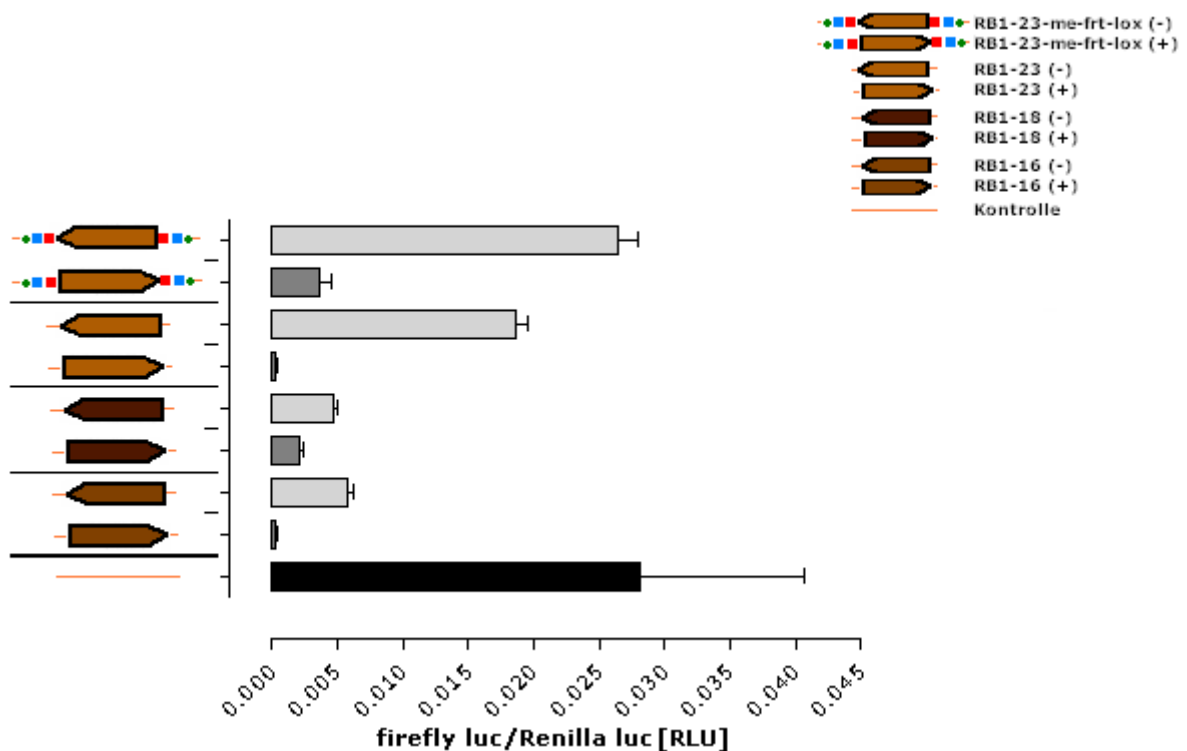
Um die auf Exons des humanen Retinoblastom Gens basierenden RB1 NMD Kassetten auf ihre NMD vermittelnde Wirkung zu untersuchen, wurden auch diese in jeweils beiden Orientierungen in das Intron des pGL2luc-lambdaIn2 Reportergen Vektors kloniert. Die so entstandenen Vektoren pGL2luc-RB1-16 (+) und (-), pGL2luc-RB1-18 (+) und (-) sowie pGL2luc-RB1-23 (+) und (-), wobei (+) das Plasmid mit dem Exon im kodierenden und (-) im nicht kodierenden Strang darstellt, wurden ebenfalls transient in die Zellen der Linie A293 transfiziert. Auch hier wurde das *Renilla* Luciferase Plasmid co-transfiziert und pGL2luc-lambdaIn2 als Kontrolle verwendet. Die luminometrische Bestimmung der Aktivität beider Luciferase Reporter erfolgte erneut 48 h nach der transienten Transfektion mit Hilfe des DLR™ Systems. Die Ergebnisse zeigen, dass durch den pGL2luc-RB1-23 (+) Vektor eine im Vergleich zum Kontrollplasmid nahezu vollständige Inaktivierung (99 %) der *firefly* Luciferase Aktivität erzielt werden konnte. Das RB1-23\* Exon wurde anschließend zur Herstellung einer induzierbaren NMD Kasette ausgewählt, die für konditionale Mutagenese eingesetzt werden kann. Dafür wurde die RB1-23 NMD Kasette in den pPCR-Script Amp SK(+) Vektor kloniert, der das Fragment mit den Erkennungssequenzen für Cre und FLP enthält. Anschließend wurde die gesamte RB1-23-me-frt-lox NMD Kasette (siehe Abbildung 2.3.7) aus dem Klonierungsvektor isoliert, in den pGL2luc-lambdaIn2 Vektor subkloniert und transient in Zellen der A293 Linie transfiziert. Mittels DLR™ System wurden die Zellen auf die Luciferase Reportergen Aktivität getestet.



**Abb. 2.3.7: RB1-23-me-frt-lox NMD Kasette zur konditionalen Mutagenese**

Die RB1-23-me-frt-lox NMD Kasette besteht aus dem Retinoblastom Exon 23, das mit Stopcodons in allen drei Leserastern modifiziert wurde, um als NMD vermittelndes Exon in der Kasette zu dienen und Teilen der für die Eigenschaften des Exons essentiellen flankierenden Introns. Die Kasette wird von mutierten Rekombinase bzw. Transposase Erkennungssequenzen flankiert, um eine Inversion der Kasette zu erzielen. bp, *branch point*; Stern (schwarz), eingeführte Stopcodons in allen drei ORFs.

Die Ergebnisse aus den durchgeführten Aktivitätsmessungen des Reporters in transfizierten Zellen mit den generierten RB1 NMD Plasmiden sind zusammengefasst in der unteren Abbildung 2.3.8 dargestellt.



**Abb. 2.3.8: Vergleich der Wirkung der RB1-16, RB1-18, RB1-23 und RB1-23-me-frt-lox NMD Kassetten auf die Aktivität des Luciferase Reporters**

Die Wirkung der NMD Kassetten wurde anhand der gemessenen *firefly* und *Renilla* Luciferase Lumineszenz ([RLU] = *relative light units*), in mit NMD Plasmiden transient transfizierten Zellen bestimmt. Die NMD Plasmide enthalten ein in zwei Exons geteiltes *firefly* Luciferase Reportergen, in dessen Intron die jeweilige NMD Kasette kloniert worden ist. (+) bzw. (-) gibt die Orientierung der jeweiligen NMD Kasette zu den Luciferase Exons an, wobei (+) für die Kasette im kodierenden und (-) im nicht kodierenden Strang steht. Als Kontrolle diente die Luciferase Aktivität der Zellen, die mit dem pGL2luc-lambdaIn2 Luciferase Kontrollplasmid, das keine NMD Kasette enthält, transient transfiziert wurden.

Mit dem Vektor pGL2luc-RB1-23 (-), in dem das NMD vermittelnde Exon im nicht kodierenden Strang der Luciferase Exons vorliegt, konnte im Vergleich zum Wildtyp Reportergen Vektor pGL2luc-lambdaIn2 eine Abnahme der Reportergen Aktivität um ein Drittel festgestellt werden. Die Luciferase Aktivität wird mit den entsprechenden



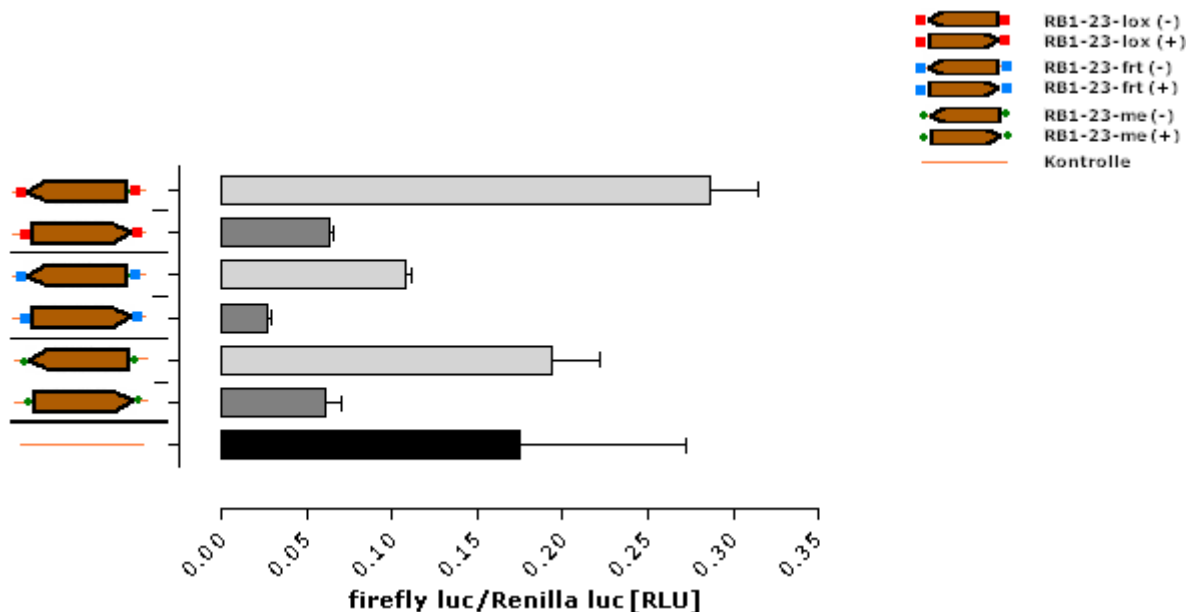
pGL2luc-RB1-16 bzw. pGL2luc-RB1-18 (-) sogar um fast 80% verringert. Zellen, die mit dem pGL2luc-RB1-23 (+) Plasmid transfiziert worden sind, zeigten verglichen mit der Kontrolle eine Luciferase Restaktivität von lediglich 1 %, was für eine vollständige Inaktivierung des Reporters spricht. Eine inaktivierende Wirkung wurde auch mit dem pGL2luc-RB1-16 (+) Plasmid erreicht, doch aufgrund der starken Beeinflussung der Luciferase Aktivität auch im nicht kodierenden Strang eignet sich das RB1-16\* Exon nicht für die Verwendung als induzierbare NMD Kasette. Mit dem pGL2luc-RB1-18 (+) Plasmid konnte keine vergleichbare Luciferase Inaktivierung erzielt werden. Mit dem modifizierten pGL2luc-RB1-23-me-frt-lox (+) Vektor, der das NMD vermittelnde RB1-23\* Exon mit flankierenden Erkennungssequenzen enthält, wurde eine wesentlich schwächere Inaktivierung der *firefly* Luciferase erzielt als mit der Kasette ohne flankierende Erkennungssequenzen. Die Luciferase Restaktivität liegt hier bei 13 % verglichen mit der Kontrolle. Die Luciferase Aktivität wurde in Zellen, die mit dem pGL2luc-RB1-23-me-frt-lox (-) Vektor transfiziert wurden, der das NMD vermittelnde Exon im nicht kodierenden Strang enthält, nicht beeinflusst und ist mit der Kontrolle vergleichbar.

Mit den Ergebnissen aus Luciferase Aktivitätsuntersuchungen konnte gezeigt werden, dass das Exon 23 des humanen Retinoblastom Gens als Bestandteil von induzierbaren NMD Kassetten zur Inaktivierung von Zielgenen geeignet ist.

#### **2.3.4.2 Funktionsanalysen der modifizierten Retinoblastom Exon 23 basierenden induzierbaren NMD Kassetten**

Da die flankierenden Erkennungssequenzen vermutlich an der Reduzierung der NMD vermittelnden Wirkung der generierten NMD Kassetten beteiligt sind, sollte untersucht werden, ob alle Motive gleichermaßen eine induzierbare NMD Kasette beeinflussen. Um darüber eine Aussage treffen zu können, wurden RB1-23 NMD Kassetten hergestellt, die jeweils nur von einer der Erkennungssequenzen flankiert vorliegen. Dazu diente der pPCR-Script Amp SK(+) Klonierungsvektor, der die RB1 Exon 23\* Sequenz von allen drei Erkennungssequenzen flankiert enthält, als Matrize in drei PCR Reaktionen mit unterschiedlichen Primerpaaren. Mit Hilfe der Oligos merb23-P1 und -P2, frtrb23-P1 und -P2 sowie loxrb23-P1 und -P2 (siehe 7.5) wurden die entsprechenden RB1-23-me, RB1-23-frt sowie RB1-23-lox NMD Kassetten amplifiziert, sequenziert und in beiden Orientierungen in den pGL2luc-lambdaIn2 Reporter-gen Vektor kloniert. Zur Ermittlung der Luciferase inaktivierenden Wirkung der hergestellten induzierbaren RB1-23 NMD Kassetten mit jeweils nur einer flankierenden Erkennungssequenz wurden die entsprechenden NMD Plasmide wie bereits beschrieben in die Zellen der A293 Linie transient transfiziert und nach 48 h mit Hilfe des DLR™ Systems auf die Luciferase Reporter-gen Aktivität in einem Mikroluminometer analysiert. Die Ergebnisse aus den

durchgeführten Messungen der Luciferase Aktivität in transfizierten Zellen mit den generierten RB1 NMD Plasmiden sind in der unteren Abbildung 2.3.9 dargestellt.



**Abbildung 2.3.9: Vergleich der Wirkung der RB1-23-me, RB1-23-frt und RB1-23-lox NMD Kassetten auf die Aktivität des Luciferase Reporters**

Die Wirkung der NMD Kassetten wurde anhand der gemessenen *firefly* und *Renilla* Luciferase Lumineszenz ([RLU] = *relative light units*), in mit NMD Plasmiden transient transfizierten Zellen bestimmt. Die NMD Plasmide enthalten ein in zwei Exons geteiltes *firefly* Luciferase Reportergen, in dessen Intron die jeweilige NMD Kasette kloniert worden ist. (+) bzw. (-) gibt die Orientierung der jeweiligen NMD Kasette zu den Luciferase Exons an, wobei (+) für die Kasette im kodierenden und (-) im nicht kodierenden Strang steht. Als Kontrolle diente die Luciferase Aktivität der Zellen, die mit dem pGL2luc-lambdaIN2 Luciferase Kontrollplasmid, das keine NMD Kasette enthält, transient transfiziert wurden.

Anhand der Ergebnisse ist zu erkennen, dass die RB1-23-frt (+) NMD Kasette verglichen mit der Kontrolle zwar die effizienteste NMD vermittelte Inaktivierung der Luciferase mit einer Restaktivität von 15 % auslöst, aber sie hat ebenfalls eine inaktivierende Wirkung auf den Reporter, wenn sie im nicht kodierenden Strang (-) vorliegt. In Zellen, die transient mit dem Plasmid transfiziert wurden, das die RB1-23-lox (-) NMD Kasette im nicht kodierenden Strang enthält, konnte eine stärkere Aktivität der Luciferase nachgewiesen werden als in Kontrollzellen. Liegt die RB1-23-lox (+) Kasette im kodierenden Strang, führt sie wie auch die RB1-23-me (+) Kasette nur zu einer 65%igen Inaktivierung des Reporters. Durch die RB1-23-me (-) Kasette im nicht kodierenden Strang wird die Luciferase Aktivität hingegen nicht beeinflusst und ist mit der Kontrolle vergleichbar. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass jede flankierende Rekombinase bzw. Transposase Zielsequenz für sich die NMD vermittelnde Wirkung von induzierbaren NMD Kassetten zur konditionalen Mutagenese negativ beeinflusst.

### 2.3.5 Kombinierte induzierbare NMD polyA Kassetten

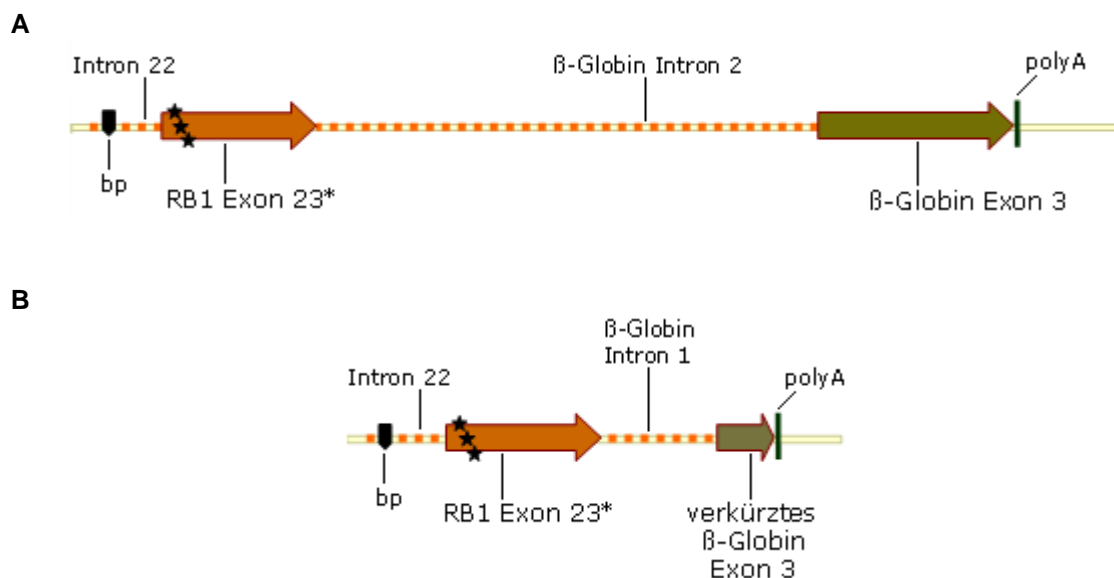
Die bisher beschriebenen Ausführungsformen der auf  $\beta_7$ -Integrin bzw. Retinoblastom Gen basierenden NMD Kassetten beinhalten nur eines der Signale, die nötig sind, um NMD auszulösen, nämlich ein prämaures Stopcodon (PTC), das mehr als 50-55 nt stromaufwärts der *splice donor site* des NMD vermittelnden Exons lokalisiert ist. Das zweite Signal, um NMD auszulösen, ist ein 3'-terminales Exon, das ein Polyadenylierungssignal (polyA) enthält [170]. Ein solches Exon wird von dem zu inaktivierenden Zielgen zur Verfügung gestellt. Die Kassetten, die nur das NMD vermittelnde Exon enthalten, können durch alternatives Spleißen aus der prä-mRNA entfernt werden, so dass nach erfolgter Prozessierung eine reife mRNA gebildet wird, die für ein unverändertes Protein kodiert. Somit würde lediglich eine unvollständige Inaktivierung des betreffenden Zielgens stattfinden, wie im Fall der  $\beta_7$ -Integrin basierenden NMD Kasette beobachtet werden konnte (Abbildung 2.3.5). Dieses Problem kann möglicherweise behoben werden, indem in eine NMD Kasette das zweite zum Auslösen von NMD notwendige Signal, also ein terminales Exon mit polyA Signal, einführt wird.

Terminale Exons werden in einer Patentschrift der Firma Regeneron als alleinige Auslöser für eine Geninaktivierung beschrieben [171]. In der als COIN (*conditionals by inversion*) bezeichneten Methode wird ein terminales Exon in ein Intron eines Zielgens inseriert. Da die Transkriptionstermination anscheinend mit der Polyadenylierung gekoppelt ist [172], führt dies nach Angaben der Erfinder zu einer vorzeitigen Termination und zu einem verkürzten Transkript, das nicht mehr für das gesamte Protein des Zielgens kodiert. Bei dieser Methode ist es von Vorteil, wenn die Insertion in das erste Intron eines Zielgens erfolgt.

Die Kombination aus einem NMD vermittelnden Exon mit einem 3'-terminalen Exon sollte also den Vorteil bieten, dass ein Terminationssignal für die Transkription erzeugt wird, wodurch verkürzte Primärtranskripte entstehen, die durch NMD degradiert werden.

Einige polyA Signale, wie z.B. das häufig verwendete SV40 polyA Signal, haben die Eigenschaft, dass sie in beiden Orientierungen als Polyadenylierungssignal wirken, was für die Verwendung in einer NMD Kasette nachteilig ist. Deshalb wurde für die Herstellung einer kombinierten NMD Kasette neben dem NMD vermittelnden Exon 23\* des Retinoblastom Gens das polyA Signal des Kaninchen  $\beta$ -Globins ausgewählt, das nur in einer Richtung wirkt [173]. In einer Version der Kasette wurde das gesamte 3'-terminale Exon 3 des  $\beta$ -Globin Gens zusammen mit seinem 5'-Intron direkt stromabwärts der *splice donor site* des RB1 Exons eingesetzt. Der Nachteil an dieser Kasette ist, dass sie aufgrund der zusätzlichen Intron und Exon Sequenz fast 1,2 kb lang ist. Weil aber bekannt ist, dass sechs Nukleotide stromaufwärts und 94 nt stromabwärts des  $\beta$ -Globin

polyA Signals ausreichend für dessen unidirektionale Funktion sind [174], wurde für eine zweite Variante der kombinierten NMD Kasette ein kürzeres Fragment synthetisiert, das die *splice acceptor site* des  $\beta$ -Globin Exon 3 und das polyA Signal sowie weitere 94 nt 3' desselben umfasst. Des Weiteren wurde in diesem Konstrukt die Intron 2 Sequenz durch das wesentlich kürzere Intron 1 ersetzt, so dass diese kombinierte NMD Kasette nur noch etwa 550 bp lang ist. Die kombinierte NMD polyA 1 Kasette, die neben dem RB1 Exon 23\* das Intron 2 und die komplette  $\beta$ -Globin Exon 3 Sequenz enthält (siehe 7.7.1), sowie die verkürzte NMD polyA 2 Ausführung mit Intron 1 (siehe 7.7.2) sind in Abbildung 2.3.10 abgebildet.



**Abb. 2.3.10: Kombinierte induzierbare NMD polyA Kassetten**

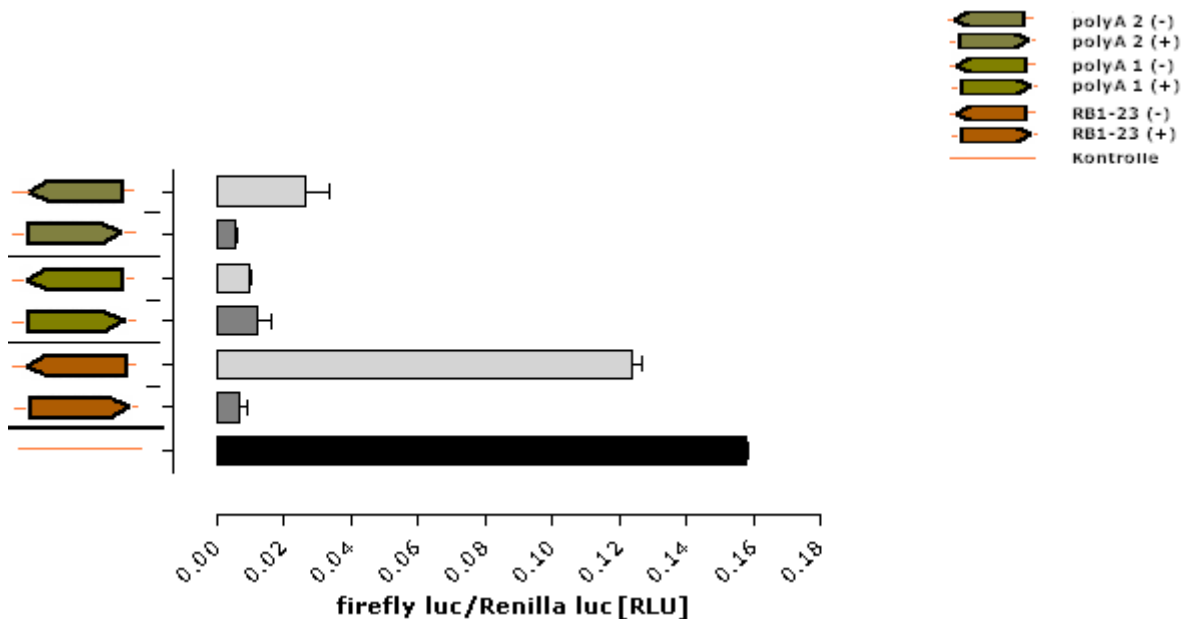
(A), polyA 1 NMD Kasette; (B), polyA 2 NMD Kasette. Die jeweilige kombinierte NMD Kasette besteht aus dem Retinoblastom Exon 23, das mit Stopcodons in allen drei Leserastern modifiziert wurde, um als NMD vermittelndes Exon in der Kasette zu dienen sowie aus Introns. Zusätzlich enthalten die Kassetten ein vollständiges (A) bzw. verkürztes (B) 3'-terminales Exon 3 des  $\beta$ -Globin Gens mit Polyadenylierungssignal. bp, *branch point*; Stern, eingeführtes Stopcodon in allen drei ORFs; polyA, Polyadenylierungssignal.

Beide NMD polyA Kassetten wurden anschließend darauf getestet, ob sie eine effiziente NMD vermittelte Inaktivierung eines Zielgens auslösen können.

### 2.3.5.1 Funktionsanalysen der kombinierten induzierbaren NMD polyA Kassetten

Um die Wirksamkeit der synthetisierten kombinierten induzierbaren NMD Kassetten zu untersuchen, wurden diese in das Intron des pGL2luc-lambdaIn2 Reporter Vektors in beiden Orientierungen kloniert, transient in die Zellen der A293 Zelllinie transfiziert und nach 48 h zur Ermittlung der *firefly* und *Renilla* Luciferase Aktivität mit Hilfe des DLR™ Systems lysiert. Die Ergebnisse aus den luminometrischen Messungen, die die NMD vermittelnde Wirkung der NMD Kasette widerspiegeln, sind in Abbildung 2.3.11 gezeigt.

Die NMD vermittelnde Wirkung der RB1-23 (+) und (-) Kassette wurde zum Vergleich mitbestimmt.



**Abbildung 2.3.11: Vergleich der Wirkung der RB1-23 Kassette sowie der kombinierten NMD Kassetten polyA 1 und polyA 2 auf die Aktivität des Luciferase Reporters**

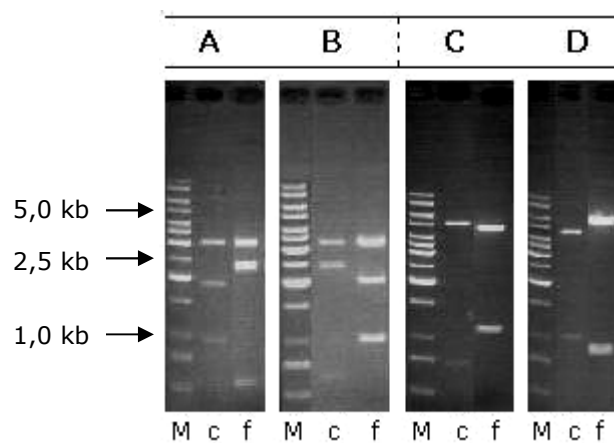
Die Wirkung der NMD Kassetten wurde anhand der gemessenen *firefly* und *Renilla* Luciferase Lumineszenz ([RLU] = *relative light units*), in mit NMD Plasmiden transient transfizierten Zellen bestimmt. Die NMD Plasmide enthalten ein in zwei Exons geteiltes *firefly* Luciferase Reportergen, in dessen Intron die jeweilige NMD Kassette kloniert worden ist. (+) bzw. (-) gibt die Orientierung der jeweiligen NMD Kassette zu den Luciferase Exons an, wobei (+) für die Kassette im kodierenden und (-) im nicht kodierenden Strang steht. Als Kontrolle diente die Luciferase Aktivität der Zellen, die mit dem pGL2luc-lambdaIN2 Luciferase Kontrollplasmid, das keine NMD Kassette enthält, transient transfiziert wurden.

Die Ergebnisse zeigen, dass wenn die polyA 2 NMD Kassette im kodierenden Strang vorliegt, eine Luciferase inaktivierende Wirkung erzielt werden kann, die mit der der RB1-23 Kassette, die NMD allein aufgrund eines PTC vermittelt, annähernd gleich ist. Die inaktivierende Wirkung der polyA 1 NMD Kassette ist dagegen etwas schwächer. In Zellen, die mit den Plasmiden pGL2luc-polyA 1 und 2 (-) transfiziert wurden, die die jeweilige kombinierte NMD polyA Kassette im nicht kodierenden Strang enthalten, konnte jedoch ebenfalls eine reduzierte Luciferase Aktivität ermittelt werden. Der Einfluss der polyA 1 NMD Kassette auf die Reporter Aktivität ist dabei genauso stark wie der der Kassette im kodierenden Strang.

Insgesamt kann festgestellt werden, dass die inaktivierende Wirkung der kombinierten NMD polyA Kassetten im kodierenden Strang vergleichbar ist mit der Wirkung der Kassette, die kein zusätzliches 3'-terminales Exon mit polyA Signal enthält. Die Luciferase Reporter Aktivität wird aber auch beeinflusst, wenn die kombinierten Kassetten im nicht kodierenden Strang lokalisiert vorliegen.

### 2.3.6 Untersuchung der Funktionalität der Rekombinase Zielsequenzen

Zur Überprüfung der *in vivo* Funktionalität der verwendeten mutierten lox66/71 und FRT LE/RE Erkennungssequenzen für die Cre bzw. FLP Rekombinase wurden die erzeugten induzierbaren NMD Plasmide in einen Cre bzw. FLP exprimierenden *E. coli* Stamm (294-Cre bzw. 294-FLP) [155] transformiert. Anschließend wurden die erhaltenen Transformanten mit Hilfe von Restriktionsverdauanalysen auf eine erfolgreiche Inversion der NMD Kassetten getestet. Dazu wurden die isolierten Plasmid DNAs mit geeigneten Restriktionsendonukleasen inkubiert und die Verdauansätze anschließend zur Abschätzung der erwarteten Fragmente gelelektrophoretisch aufgetrennt. Zu Demonstrationszwecken wurde von jedem erzeugten induzierbaren NMD Plasmid (A)-(D), das eine mit Erkennungssequenzen flankierte NMD Kasette enthält, jeweils eine aus 294-Cre bzw. 294-FLP Transformationen isolierte und verdaute Plasmid DNA auf ein Gel aufgetragen. Das Ergebnis der gelelektrophoretischen Auftrennung ist in Abbildung 2.3.12. gezeigt.



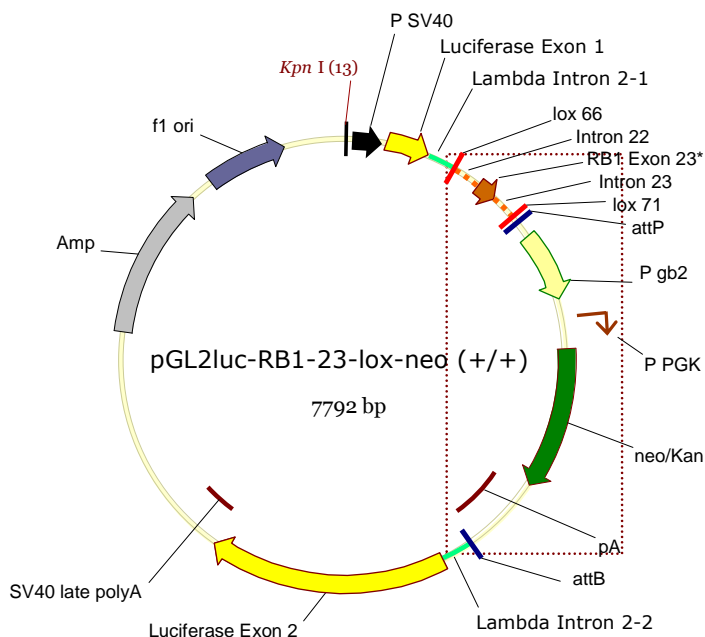
**Abb. 2.3.12: Gelelektrophoretische Auftrennung von NMD Vektoren**

Verdauanalysen der isolierten Plasmid DNAs (A) und (B) pGL2luc-itgb7-me-frt-lox (+) bzw. (-), (C) und (D) pGL2luc-RB1-23-me-frt-lox (+) bzw. (-) nach erfolgter Transformation in 294-Cre (c) bzw. 294-FLP (f) Bakterien zur Inversion der entsprechenden NMD Kasette. Ein *AvrII/BamHI* Doppelverdau ergibt nach erfolgreicher Cre bzw. FLP vermittelter Inversion bei (A) die Fragmente 3082 bp, 1895 bp, 958 bp und bei (B) die Fragmente 3082 bp, 2298 bp, 555 bp. Ein *NheI* Verdau ergibt nach erfolgreicher Cre bzw. FLP vermittelter Inversion bei (C) die Fragmente 5113 bp, 724 bp und bei (D) die Fragmente 4754 bp, 1083 bp. Die 5,0 kb und 2,5 kb und 1,0 kb Banden des DNA Markers (M) sind durch Pfeile gekennzeichnet.

Anhand der gezeigten Ergebnisse aus Verdauanalysen von Plasmid DNAs, die aus den Transformationen der ursprünglichen NMD Plasmide in 294-Cre bzw. 294-FLP Bakterien hervorgegangen sind, ist zu erkennen, dass nur an den lox66/71 Rekombinase Erkennungssequenzen eine erfolgreiche Inversion der NMD Kasette erzielt werden konnte. An den FRT LE/RE Zielsequenzen hat keine FLP vermittelte Rekombination stattgefunden.

### 2.3.7 Untersuchung der Funktionalität von induzierbaren NMD Kassetten mittels stabiler Transfektion

Nachdem die Funktionalität der generierten  $\beta 7$ -Integrin Exon 14 und Retinoblastom Exon 23 basierenden NMD Kassetten in transienten Transfektion bestätigt worden ist, sollte ihre NMD vermittelnde Wirkung auch in einem stabilen System untersucht werden. Weil mit dem RB1-23\* NMD vermittelnden Exon die effizienteste Inaktivierung der Luciferase Aktivität erzielt werden konnte und weil an den mutierten Sequenzen FRT LE/RE keine Inversion der Kasette möglich war, wurden für stabile Transfektionen die Vektoren pGL2luc-RB1-23-lox (+) und (-) ausgewählt. NMD Kassetten, die nur von einer Erkennungsstelle flankiert werden, erlauben auch eine konditionale Mutagenese von Zielgenen. Für ein konditionales *gene targeting* Experiment muss eine solche Kasette zuerst in umgekehrter Orientierung in ein Intron eines Zielgens inseriert werden, so dass sie inaktiv im nicht kodierenden Strang vorliegt. Nach Cre vermittelter Inversion, wodurch die NMD Kasette aktiviert wird, entsteht ein Primärtranskript, das durch ein PTC gekennzeichnet ist und durch den NMD Prozess degradiert wird, wodurch eine Inaktivierung des Zielgens erfolgt. Um für Zellklone, die eine Kopie des Konstrukts zufällig in ihr Genom integriert haben, selektionieren zu können, sollten die NMD Kassetten mit einem Resistenzgen versehen werden. Dazu wurde in die beiden pGL2luc-RB1-23-lox Plasmide die attP/attB flankierte Neomycin Selektionskasette, die unter der Kontrolle eines prokaryotischen und eukaryotischen Promotors steht, direkt stromabwärts der lox 66/71 flankierten NMD Kasette kloniert, so dass sie ebenfalls im Intron zwischen den beiden Luciferase Exons lokalisiert vorliegt. Um zusätzlich zu prüfen, ob die Orientierung des Resistenzmarkers einen Einfluss auf die Wirkung der NMD Kasette hat, wurde das 2 kb *neo* Fragment in beiden Orientierungen in den jeweiligen Vektor kloniert. Auf diese Weise konnten für die stabile Transfektion vier verschiedene NMD Plasmide generiert werden, die das NMD vermittelnde Exon und das *neo* Resistenzgen in derselben Orientierung (+/+) bzw. (-/-) sowie in entgegengesetzter Ausrichtung (+/-) oder (-/+) enthalten. Mit der NMD Kasette im kodierenden Strang, was für die Plasmide pGL2luc-RB1-23-lox (+/+) und (+/-) zutrifft, sollte wie bereits beschrieben eine NMD vermittelte Inaktivierung der Luciferase Aktivität erfolgen, während in den Plasmiden pGL2luc-RB1-23-lox (-/+) und (-/-) die Kasette im nicht kodierenden Strang vorliegt, so dass das NMD vermittelnde Exon herausgespleißt werden und keinen Einfluss auf die Luciferase Aktivität haben sollte. Beispielhaft für alle vier NMD Plasmide ist in Abbildung 2.3.13 das pGL2luc-RB1-23-lox-neo (+/+) Plasmid, das die RB1-23\* Exon und *neo* Sequenz im kodierenden Strang enthält, mit allen Bestandteilen der NMD Kasette sowie den Vektor eigenen Sequenzen dargestellt. Das Rechteck markiert den Bereich, in dem sich die Konstrukte aufgrund der Orientierung des RB1-23\* Exons und der Selektionskasette unterscheiden.



**Abb. 2.3.13: pGL2luc-RB1-23-lox-neo (+/+) NMD Vektor**

Der pGL2luc-RB1-23-lox-neo (+/+) NMD Expressionsvektor enthält das NMD vermittelnde Exon RB1-23 im kodierenden Strang und eine in der gleichen Orientierung inserierte *neo* Selektionskassette im Lambda Intron 2 (eingekreister Bereich). Alle Bestandteile des Vektors sind mit aufgeführt.

Als Zelllinie, in die die NMD Plasmide stabil transfiziert werden sollten, wurde die murine embryonale Stammzelllinie IB10.1 ausgewählt. Damit nach stabiler Integration des jeweiligen NMD Vektors in das Zellgenom eine Quantifizierung der *firefly* Luciferase möglich wird, musste zunächst eine stabile *Renilla* Luciferase Expression in den Zellen erzielt werden. Dazu wurden IB10.1 Zellen mit dem linearisierten pGL4.76[hRluc/Hygro] Plasmid transfiziert, das ein synthetisches *Renilla* Luciferase Gen und das *Hygromycin B* Phosphotransferase Gen als eukaryotischen Selektionsmarker enthält. Nach Selektion mit Hygromycin B konnten insgesamt 39 Hygromycin resistente Klone identifiziert und auf *Renilla* Luciferase Expression mit dem DLR™ System analysiert werden. Als Kontrolle dienten Wildtyp IB10.1 Zellen, die kein Luciferase Gen enthalten. Neun der untersuchten Zellklone zeigten eine deutliche *Renilla* Aktivität. Die Ergebnisse aus der Messung der *Renilla* Luciferase Aktivität dieser neun Klone sind in Tabelle 2.3.1 zusammengefasst.

Klon	IB10.1	R-8	R-14	R-15	R-20	R-26	R-29	<b>R-33</b>	R-37	R-39
<b>Renilla luc [RLU]</b>	178	8969	250113	6171	3735	2869	1008	<b>44151</b>	1249	1032

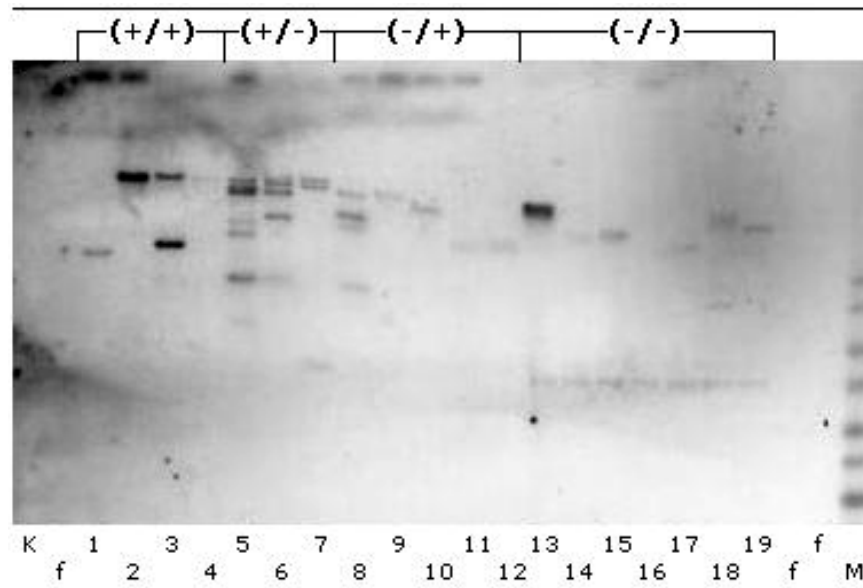
**Tabelle 2.3.1: *Renilla* Luciferase Aktivität der Hygromycin resistenten Zellklone**



Der Klon R-33 wurde für weitere Arbeiten ausgewählt und mit dem entsprechenden linearisierten pGL2luc-RB1-23-lox-neo (+/+), (+/-), (-/+) bzw. (-/-) NMD Plasmid stabil transfiziert. Die transfizierten Zellen wurden zur Identifizierung von stabil integrierten *firefly* Luciferase NMD Konstrukten im Selektionsmedium kultiviert, das neben Hygromycin B auch G418 (= Geneticin) enthielt. Nach der Selektion wurden insgesamt 81 resistente Klone isoliert, von denen 55 erfolgreich zur weiteren Analyse expandiert werden konnten. Dabei handelte es sich um elf Klone aus der Transfektion mit dem pGL2luc-RB1-23-lox-neo (+/+) NMD Plasmid und dreizehn mit dem entsprechenden (+/-), siebzehn mit (-/+) sowie vierzehn Klone mit dem (-/-) NMD Vektor. Die Klone wurden, nachdem sie im subkonfluenten Stadium vorlagen, auf jeweils fünf 96-Loch Mikrotiterplatten gesplittet, von denen eine Replikplatte eingefroren wurde. Die Zellklone auf den restlichen Platten wurden für nachfolgende Analysen zur Bestimmung der Kopienzahl, der Luciferase Aktivität und für ein initiales Experiment zur Hemmung der Protein Biosynthese weiter kultiviert.

### **Bestimmung der Kopienzahl des integrierten *firefly* Luciferase NMD Konstrukts**

Nach einer Transfektion können DNA Fragmente als Einzelkopien oder als Kette, die sich aus mehreren Fragmentkopien zusammensetzt, an Stellen, an denen zufällig Doppelstrangbrüche entstanden sind, in das Genom der Zielzellen integriert werden [175]. Da die Luciferase Aktivität proportional zu der Kopienzahl der zufällig integrierten *firefly* Luciferase NMD Konstrukts sein sollte, wurden die Zellklone mittels Southern Blot auf die Kopienzahl untersucht, um nach einer luminometrischen Untersuchung der Klone die tatsächliche *firefly* Luciferase Aktivität genauer beurteilen zu können. Für diese Zwecke wurde genomische ES-Zell DNA der isolierten Klone und des R-33 Klons mit *KpnI* geschnitten, gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine feste Nylonmembran transferiert. Da sich die kodierenden Sequenzen der *firefly* und *Renilla* Luciferasen unterscheiden, kann mit einer spezifischen radioaktiv markierten Sonde entweder der eine oder andere Reporter nachgewiesen werden. Die Hybridisierung erfolgte mit einer 1,1 kb langen radioaktiv markierten DNA Sonde, die durch einen *MfeI/XbaI* Deppelverdau aus dem pGL2luc-lambdaIn2 Reporter Plasmid gewonnen wurde und fast die gesamte Sequenz des *firefly* Luciferase Exons 2 beinhaltet. Der Southern Blot, mit dem neunzehn NMD Klone auf die Kopienzahl des Konstrukts analysiert wurden, ist in Abbildung 2.3.14 gezeigt.



**Abb. 2.3.14: Autoradiogramm eines Southern Blot zur Bestimmung der Kopienzahl der *firefly* Luciferase NMD Konstrukte**

(+/+), (+/-), (-/+), (-/-) steht für Klone, die mit dem entsprechenden pGL2luc-RB1-23-lox-neo NMD Plasmid stabil transfiziert worden sind. Alle Klone, außer der R-33 Kontrolle (K), enthalten mindestens eine Kopie des entsprechenden *firefly* Luciferase NMD Konstrukts. K, Kontrollklon R-33, der nur *Renilla* Luciferase exprimiert; 1-19, Zellklone aus der stabilen Transfektion, aus denen chromosomale DNA isoliert und analysiert wurde; f, freie Spur; M, Marker.

Auf dem Autoradiogramm ist für den Kontrollklon R-33 (K), der das *Renilla* Luciferase Reportergen stabil im Genom enthält, keine Luciferase mRNA detektierbar. Das zeigt, dass die Sonde spezifisch und somit für den Nachweis der *firefly* Luciferase geeignet ist. An der Anzahl der Banden, die die Konstrukte im Zellgenom repräsentieren, ist zu erkennen, dass die neunzehn analysierten NMD Klone jeweils mehrere Kopien des *firefly* Luciferase NMD Konstrukts an verschiedenen Stellen im Genom enthalten. Die starke Intensität der Banden in den Spuren 2, 3 und 13 könnte darauf hinweisen, dass hier mehrere Konstrukte nah beieinander ins Genom integriert wurden. Die unterschiedlichen Kopienzahlen müssen bei der Beurteilung der Reportergen Aktivität in den Klonen nach ihrer luminometrischen Bestimmung mitberücksichtigt werden.

### Bestimmung der *firefly* Luciferase Aktivität

Um die *firefly* Luciferase Aktivität in den isolierten NMD Klonen zu ermitteln, wurde in allen Zellklonen mittels DLR™ System die *Renilla* und *firefly* Luciferase Lumineszenz bestimmt. Es wurde erwartet, dass aufgrund des SV40 Promotors, der die Expression des *firefly* Luciferase Reportergens unabhängig von der Insertionsstelle im ES-Zellgenom kontrolliert, die Klone, die das NMD vermittelnde RB1-23\* Exon im nicht kodierenden Strang enthalten, neben der *Renilla* auch eine *firefly* Luciferase Aktivität aufweisen. Während in allen Klonen die *Renilla* Expression nachgewiesen werden konnte, zeigte keiner der Zellklone *firefly* Luciferase Aktivität. Auch die Zellklone, in die eine stabile

Transfektion der Vektoren erfolgt war, in denen das NMD vermittelnde Exon im kodierenden Strang vorliegt, konnte keine *firefly* Reporter Aktivität nachgewiesen werden. Dies war zwar wegen der Orientierung der Kasette zu erwarten, aber aufgrund der fehlenden nicht inaktivierten Kontrolle kann weder eine Aussage über die Wirkung der NMD Kasette noch über den möglichen Einfluss durch die Orientierung der Neomycin Selektionskasette auf den NMD Prozess gemacht werden.

### **Hemmung der Protein Biosynthese**

Weil von Zielgenen, die nach einer Mutagenese PTCs enthalten, keine mRNA nachgewiesen werden kann, ist das Fehlen der Transkripte ein Zeichen für ihre Degradierung durch den *nonsense mediated mRNA decay* Prozess. Um nachzuweisen, dass die Inaktivierung der Luciferase Aktivität auf der Degradierung der Transkripte durch ein NMD vermittelndes Exon beruht, sollen die NMD Klone mittels Northern Blot auf das Vorhandensein von *firefly* Luciferase mRNA untersucht werden.

Einige Substrate inhibieren die Protein Biosynthese in Eukaryoten, indem sie, wie z.B. Emetine, die Elongation der Polypeptidkette hemmen. Weil aber die Funktion der Translation für die NMD Aktivierung erforderlich ist, wird durch ihre Hemmung zwangsläufig auch der NMD Prozess verhindert, so dass fehlerhafte mRNAs, die PTCs enthalten, nicht mehr degradiert werden und nachgewiesen werden können [176, 177]. Der Nachweis von Luciferase Transkripten in mit Emetine kultivierten Zellklonen, die das NMD vermittelnde Exon im kodierenden Strang zwischen den Exons des Luciferase Reportergens enthalten, würde bestätigen, dass die Inaktivierung der Luciferase Aktivität auf NMD beruht, wenn gleichzeitig in denselben Zellklonen, die ohne den Inhibitor inkubiert wurden, keine Luciferase RNA nachgewiesen werden kann. In Zellen, die das NMD vermittelnde Exon im nicht kodierenden Strang enthalten, spielt der NMD Prozess keine Rolle, so dass hier unabhängig von Emetine Luciferase RNA nachweisbar sein sollte. In einem initialen Experiment, um die Protein Biosynthese zu hemmen und dadurch Transkripte identifizieren zu können, die eigentlich dem NMD Prozess zugeführt und degradiert werden, wurden alle Zellklone im Medium mit 100 µg/ml Emetine kultiviert. Zur Kontrolle erfolgte eine gleichzeitige Inkubation im Selektionsmedium. Bereits nach einer vierstündigen Inkubation mit Emetine wurde der Zelltod von allen im Emetine-Medium kultivierten Zellklonen festgestellt. Um eine effiziente Inhibition der Protein Biosynthese und damit auch des NMD Prozesses sicherzustellen, sollten Zellen vor der RNA Isolierung mehrere Stunden mit 100 µg/ml Emetine inkubiert werden [178, 179]. Ob eine effiziente Hemmung der Protein Biosynthese auch mit geringeren Emetine Konzentrationen und kürzeren Inkubationszeiten erzielt werden kann, muss in weiteren Experimenten untersucht werden.

### 3. Diskussion und Ausblick

#### 3.1 Bifunktionale Cre Expressionskonstrukte

Um die Herstellung transgener Cre Mäuse zu vereinfachen, wurde ein bifunktionales Cre Konstrukt generiert, das von der Expression eines Hormon abhängigen Fusionsproteins durch FLP vermittelte Rekombination auf die Expression eines konstitutiv aktiven Fusionsproteins *in vivo* umgeschaltet werden kann (regulierbar zu konstitutiv aktiv) [152]. Ausgehend von diesem bifunktionalen Cre-FRT-ERT2-FRT Konstrukt wurden weitere unterschiedliche Cre Expressionskonstrukte hergestellt, mit denen untersucht wurde, ob das ermittelte Signal-zu-Rausch Verhältnis (Liganden induzierte Rekombination zu Hintergrundrekombination) der Liganden induzierbaren Cre-FRT-ERT2 Fusionsrekombinase durch zusätzliche LBDs von Hormonrezeptoren am N- bzw. C-Terminus der Cre kodierenden Sequenz verbessert werden kann. Als mit Cre fusionierte Proteine wurden zusätzliche Liganden bindende Domänen (LBDs) des mutierten humanen Östrogenrezeptors (ERT2) sowie die LBD der mutierten Form PR676-914 des Progesteronrezeptors verwendet. Beide mutierten Liganden bindenden Domänen zeigen nur eine Bindungsaffinität zu den synthetische Liganden 4-OHT bzw. RU486, so dass eine unkontrollierte Aktivierung durch die endogenen im Plasma vorkommenden Steroidhormonen 17 $\beta$ -Östradiol (E2) bzw. Progesteron (PR) ausgeschlossen werden kann [111, 126]. Außerdem wurde ein bifunktionales Cre Expressionskonstrukt erzeugt, das in der ursprünglichen Form die Expression einer konstitutiv aktiven Cre-FRT-NLS Fusionsrekombinase erlaubt, die nach FLP vermittelter Rekombination in eine Liganden induzierbare Cre-FRT-ERT2 Variante umgeschaltet werden kann (konstitutiv aktiv zu regulierbar). Bislang werden transgene Mäuse, die eine konstitutiv aktive Cre Rekombinase bzw. eine Hormon abhängige Cre-ERT2 Fusionsrekombinase ubiquitär oder gewebespezifisch exprimieren mittels unabhängig voneinander generierter Cre Konstrukte erzeugt [82, 84, 94, 117]. Diese Mausstämme müssen jeweils für ihre Gewebe- oder Zelltypspezifikation durch Verpaarungen mit Reporter Mäusen analysiert werden [86, 87]. Spätere Untersuchungen der Genfunktion erfolgen dann an Mäusen, die aus Verpaarungen von geflochten mit den unabhängig voneinander erzeugten Cre exprimierenden Tieren hervorgegangen sind. Der Vorteil eines bifunktionalen Konstrukts ist, dass ein Konstrukt ausreichen würde, um mittels *gene targeting* oder durch Mikroinjektion des transgenen Konstrukts in Oozyten entsprechende Organismen erzeugen zu können, wodurch der spätere Analysenaufwand verringert würde.

Der Funktionswechsel der Cre Expressionskonstrukte wurde *in vivo* mittels FLP Rekombinase exprimierenden *E. coli* Bakterien (294-FLP) [155], Restriktionsanalysen zum Nachweis der Deletion eines FRT bzw. F5 flankierten Bereichs und anschließenden Transfektionen der Ursprungsplasmide sowie der resultierenden Vektoren in Zellen der CV1-B5 Reportergeren Zelllinie [110] nachgewiesen.

#### 3.1.1 Die Rekombinase Zielsequenzen sind funktionell

Weil das Umschalten in murinen embryonalen Stammzellen und anderen eukaryotischen Zellen von der Expression und Rekombinationsaktivität der FLP Rekombinase abhängt und keine zusätzlichen Co-Faktoren benötigt, reicht die Transformation der bifunktionalen Cre Expressionsplasmide in FLP Rekombinase exprimierende Bakterien (294-FLP) [155] zum funktionellen Nachweis der *in vivo* Deletion aus. In transgenen Mäusen würde der Wechsel von der einen Cre Form auf die andere Cre Expressionsvariante durch eine Verpaarung mit einer FLP bzw. FLPe *deleter* Maus erfolgen, die entweder die FLP [83] oder FLPe Rekombinase [34] in der Zygote exprimiert. Während durch Analysen von Verdaureaktionen gezeigt werden konnte, dass die FLP vermittelte Deletion der Bereiche, die ausschließlich von FRT Erkennungssequenzen [23] flankiert werden, in allen Cre Expressionsplasmiden vollständig war, wurde im Gegensatz dazu festgestellt, dass in dem doppelt fusionierten pcF5-ERT2-Cre-ERT2-FRT Plasmid nach Transformation in 294-FLP Bakterien bevorzugt die Deletion der F5 flankierten Region erfolgte. Bei F5 Zielsequenzen handelt es sich um eine alternative Form der Wildtyp FRT Erkennungssequenz, die Mutationen in der Kernregion enthält und deshalb zu den *spacer* Mutanten gezählt wird [49]. Durch die Verwendung der F5 Sequenzen zum Flankieren der N-terminalen ERT2 Domäne in dem Konstrukt, wurde sichergestellt, dass nicht die gesamte ERT2-Cre-ERT2 Kasette durch FLP vermittelte Rekombination deletiert wird, da eine Rekombinationsreaktion nur zwischen homo- aber nicht heterotypischen Erkennungssequenzen erfolgt [50]. Weil eine sequenzspezifische Rekombinationsfrequenz bei Cre und FLP von der Entfernung zwischen Rekombinase Zielsequenzen abhängt [74], wird diese Beobachtung darauf zurückgeführt, dass die F5 Sequenzen näher beieinander im Konstrukt lokalisiert vorliegen. Dies hängt damit zusammen, dass die F5 Motive nur die N-terminale ERT2 Domäne flankieren, während sich die FRT flankierte Region aus der C-terminalen ERT2 kodierenden Sequenz sowie einem SV40 polyA Signal zusammensetzt (Abbildung 2.1.4), wodurch die FRT Erkennungssequenzen etwa 300 bp weiter voneinander entfernt sind als die F5 Sequenzen.

### **3.1.2 Cre vermittelte Aktivität der bifunktionalen Expressionskonstrukte kann mittels Dual-Light® System bestimmt werden**

Die Eigenschaften der Hormon abhängigen und konstitutiv aktiven Cre Fusionsproteine wurden durch die Detektion Cre vermittelter Aktivität mittels Dual-Light® System [158] in Zellen der CV1-B5 Reportergeren Zelllinie [110] ermittelt, die mit den Cre Expressionsvektoren transient transfiziert worden sind. Durch Vergleiche von Ergebnissen aus unabhängigen Transfektion, konnte eine Streuung der Messwerte zwischen Experimenten, die an unterschiedlichen Tagen auf 96 Loch Platten erfolgten, festgestellt werden. Für die beobachteten Unterschiede in den Messergebnissen werden verschiedene Ursachen in Betracht gezogen. Zum einen ist aufgrund der Instabilität der *firefly* Luciferase die Zeitspanne zwischen Zellyse und Lumineszenzmessung entscheidend. Um eine starke Lumineszenz detektieren zu können, muss die Messung unmittelbar nach der Aufarbeitung der Zellen erfolge, weil nach Angaben des Herstellers die Zeitspanne, in der eine Lichtemission gemessen werden kann, nur etwa fünf Minuten nach Aktivierung der Luciferase beträgt. Zum anderen konnte beobachtet werden, dass die Transfektionseffizienz von der Zellzyklusphase abhängt und auch davon, wie oft die Zellen vor der Durchführung der Transfektion passagiert worden sind. Dass die Cre Protein Aufnahme in der G1 Zellzyklusphase reduziert ist, konnte bereits nachgewiesen werden [180]. Möglicherweise ist auch die Aufnahme von DNA Komplexen, die durch Transfektionsreagenzien wie FuGENE 6 gebildet werden, von der Zellzyklusphase der Zellen abhängig. Aus diesen Gründen können immer nur die gemessenen Lumineszenzwerte [RLU] aus einem Transfektionsexperiments miteinander verglichen werden.

### **3.1.3 Konstrukte mit multiplen LBDs zeigen ein schlechtes Signal-zu-Rausch Verhältnis**

Mit dem Expressionsplasmid pcCre-FRT-2xERT2-FRT, das eine zweite C-terminal mit der Cre Sequenz fusionierte ERT2 Domäne enthält, konnten niedrige Rekombinationswerte in Abwesenheit des Induktors und eine mit der Kontrolle vergleichbare Cre Aktivität nach Induktion mit 4-OHT ermittelt werden. Mit einer dritten C-terminal fusionierten ERT2 Domäne dagegen wurde die Induzierbarkeit und folglich die Aktivität der Hormon abhängigen Cre Form erheblich verringert. Als Gründe für diese Beobachtung werden die verwendete Konzentration des synthetischen Liganden zur Induktion und/oder die Größe des Fusionsproteins angenommen. Während 1 µM 4-OHT für die Aktivierung und anschließende Translokation der mit zwei ERT2 Domänen fusionierten Rekombinase in den Zellkern noch genügt, könnte diese Konzentration für eine effiziente Induktion der Cre-FRT-3xERT2 Variante nicht mehr ausreichen. Da eine hohe 4-OHT Konzentration

einen toxischen Effekt auf Säugerzellen hat [111], ist es nicht ratsam, die Liganden Konzentration zu erhöhen, um möglicherweise eine bessere Induzierbarkeit der Fusionsrekombinase zu ermöglichen. Es ist jedoch auch möglich, dass das Fusionsprotein aufgrund seiner Größe nur schwer durch die Kernporen in den Nukleus migrieren kann, was bereits auch im Fall der  $\phi$ C31 Integrase beobachtet werden konnte, die anschließend für eine effiziente Translokation mit einem C-terminalen NLS fusioniert wurde [32]. Induzierbare Fusionsproteine sollten jedoch kein NLS enthalten, um die Hintergrundrekombination nicht zu erhöhen [108].

Um das Problem der Hintergrundrekombination zu überwinden, wurde von Zhang und Kollegen ein Cre Protein entwickelt, das am N- und C-Terminus mit der mutierten Liganden bindenden Domäne (Mer) des murinen Östrogenrezeptors fusioniert ist [100]. In ES-Zellen, die diese Mer-Cre-Mer Fusionsrekombinase exprimierten, konnte keine Rekombination in Abwesenheit des Induktors nachgewiesen werden, während dieses doppelte Fusionsprotein ein funktionsfähiges Enzym darstellte, das nach erfolgter Induktion mit dem Liganden eine sequenzspezifische Rekombination vermitteln konnte. Die Rekombinationseffizienz war dabei mit der des ursprünglichen Cre-Mer Enzyms vergleichbar [100]. Ein Fusionsenzym mit zwei LBDs des Progesteronrezeptors an beiden Cre Termini, das von Kellendonk und Kollegen generiert wurde, zeigte auch keine Hintergrundaktivität, aber nur eine sehr schwache Aktivität nach Induktion mit RU486 [110]. Mit einem weiteren von Casanova und Kollegen hergestellten doppelt fusionierten Protein aus iCre (*improved* Cre) und ERT2 (ERiCreER), konnte ebenfalls in transienten Transfektionen von Zellen der CV1-B5 Linie keinerlei Rekombination ohne vorherige Induktion nachgewiesen werden. Die Aktivität der stimulierten ERiCreER Rekombinase war im Vergleich zu MerCreMer fast doppelt so hoch [116]. Im Fall des hergestellten ähnlich aufgebauten Doppelfusionsproteins F5-ERT2-Cre-ERT2-FRT wurde ebenfalls keine Hintergrundrekombination festgestellt, allerdings war die Rekombinationsleistung des Cre Proteins trotz Induktion mit 4-OHT schwach. Auch die korrespondierende konstitutiv aktive F5-Cre-FRT-NLS Rekombinase zeigte eine stark reduzierte Aktivität im Vergleich zur Cre-FRT-NLS Variante ohne eine zusätzliche F5 Erkennungssequenz am 5' Ende. Das bifunktionale doppelt fusionierte Cre Konstrukt ist so entwickelt worden, dass das funktionelle Initiationscodon am 5' Ende auch nach FLP vermittelter Deletion der ERT2 kodierenden Regionen weiterhin erhalten bleibt, damit sowohl die induzierbare als auch die konstitutiv aktive Variante translatiert werden kann. Insofern liegt das Startcodon in dem bifunktionalen Doppelfusionskonstrukt stromaufwärts der mutierten F5 Sequenz. Da die Cre Aktivität beider Rekombinaseformen sehr schwach ist, scheint das zusätzliche F5 Motiv am 5' Ende der Cre kodierenden Sequenz entweder ihre Transkription oder die Translation zu beeinträchtigen.

Auch mit dem bifunktionalen Konstrukt, das zwei unterschiedliche mit dem C-Terminus von Cre fusionierte LBDs enthält, nämlich ERT2 und PR676-914, die jeweils einen anderen synthetischen Liganden binden, konnte kein Rekombinationshintergrund ermittelt werden, die Aktivität nach der Fusionsrekombinase nach Induktion mit beiden Liganden war jedoch schwach. Auch nach Optimierung der Induzierbarkeit durch die Verwendung unterschiedlicher 4-OHT und RU486 Konzentrationen, konnte keine hohe Aktivität erzielt werden. Es ist anzunehmen, dass die Liganden während der Aktivierung der Fusionsrekombinase miteinander interferieren, wodurch die Induktion nicht wirkungsvoll ist. Weil die Zugabe eines synthetischen Liganden ebenfalls zu keiner Cre Aktivität führt, wird angenommen, dass die LBDs nicht unabhängig wirken. Infolge einer Aktivierung mit nur einem Induktor wird das Fusionsprotein also weiterhin an Hitzeschockproteine gekoppelt überwiegend im Zytoplasma zurückgehalten, so dass keine Rekombination im Zellkern stattfinden kann [108]. Eine unabhängige Funktion der beiden LBDs könnte durch die Einführung einer Verbindung zwischen die PR und ERT2 kodierenden Sequenzen in Form eines Glycin-Serin Linkers [100] oder eines Polylinkers, wie z.B. einer *multiple cloning site* (MCS) [181], erzielt werden. Dadurch könnte unter Umständen die Wechselwirkung zwischen den beiden Liganden reduziert und so eine nur von einem Induktor abhängige Aktivierung der Fusionsrekombinase erreicht werden, die möglicherweise eine stringente Kontrolle der Cre Aktivität erlaubt.

Das induzierbare bifunktionale System basiert auf der posttranslationalen Kontrolle der Cre Expression. Eine Alternative zu induzierbaren Konstrukten, die nur ein Kontrollelement zur Cre Regulation enthalten in Form einer LBD eines Hormonrezeptors, könnte die Verwendung von induzierbaren Promotoren sein, die erlauben, die Cre Aktivität sowohl auf transkriptioneller als auch posttranslationaler Ebene zu regulieren. Ein entsprechendes System stellt das AhcreER<sup>T</sup> Konstrukt da, in dem die Cre Aktivität transkriptionell durch den  $\beta$ -Naphtoflavon ( $\beta$ NF) Ah Promotor und Liganden abhängig reguliert werden kann [182]. Mit der binär kontrollierten Cre Rekombinase konnte die Hintergrundrekombination eliminiert und eine Rekombination nach Induktion in allen Geweben nachgewiesen werden, in denen der Ah Promotor aktiv ist [182]. Um den Rekombinationshintergrund der bifunktionalen Konstrukte *in vivo* zu minimieren, könnte der zur Regulation verwendete CMV durch einen induzierbaren Promotor, wie z.B. den Interferon induzierbaren Mx1 (Myxovirus Resistenzgen) Promotor [183], ersetzt werden. Ein solches System würde dann allerdings wegen der Eigenschaften des Promotors keine gewebespezifische Kontrolle der Rekombinase Aktivität mehr erlauben.



### 3.1.4 Induzierbare Konstrukte mit einer ERT2 LBD zeigen ein gutes Signal-zu-Rausch Verhältnis

Im Fall der transienten Transfektion des pcCre-FRT-NLS Plasmids, das durch FLP vermittelte Rekombination aus dem pcCre-FRT-ERT2-FRT Vektor (regulierbar zu konstitutiv aktiv) erzeugt wurde [152], des neu generierten pcCre-FRT-NLS-FRT Vektors (konstitutiv aktiv zu regulierbar) und des als Positivkontrolle eingesetzten pBKEF-NLSCre Vektors wurden vergleichbare Lumineszenzwerte ermittelt. Das zeigt, dass die beiden das Cre-FRT-NLS Fusionsprotein exprimierenden Plasmide genauso effizient sind wie die Kontrolle, die für eine NLS-Cre Rekombinase kodiert. Anhand der erhaltenen Messdaten aus Transfektionen des induzierbaren pcCre-FRT-ERT2-FRT (regulierbar zu konstitutiv aktiv) [152] und des vergleichbaren aus dem neu generierten bifunktionalen Vektors (konstitutiv aktiv zu regulierbar) hervorgegangenen pcCre-FRT-ERT2 Plasmids, konnte durch einen Vergleich mit nicht transfizierten CV1-B5 Reporterzellen, die als Negativkontrolle dienten, ohne die Zugabe des synthetischen Liganden 4-OHT nur eine schwache  $\beta$ -Galactosidase Expression beobachtet werden. Da in Kontrollzellen, die unter gleichen Bedingungen kultiviert worden sind, keine  $\beta$ -Galactosidase Aktivität detektiert werden konnte, repräsentiert diese Aktivität den Rekombinationshintergrund der Cre-FRT-ERT2 Fusionsproteine in Abwesenheit des induzierenden Liganden. Das lässt darauf schließen, dass diese Enzymformen auch ohne 4-OHT in der Lage sind, in den Zellkern zu migrieren, wo sie eine Deletion einer loxP flankierten DNA Region einleiten können. Die Kontrolle, die von der ERT2 Domäne auf die Cre Rekombinase ausgeübt wird, ist zwar stark aber nicht absolut. Als Erklärung für Hintergrundaktivitäten wird angenommen, dass die regulatorische von der enzymatischen Untereinheit eines Hormon abhängigen Fusionsproteins durch intrazelluläre Proteasen getrennt wird, woraus eine schwache unkontrollierte Rekombination resultiert [100]. Eine weitere Ursache für beobachtete Hintergrundrekombinationen könnten kryptische *splice sites* sein, die innerhalb der Cre und LBD Sequenz lokalisiert sind. Solche Sequenzen können dazu führen, dass es zu abweichenden Spleißreaktionen innerhalb des Primärtranskripts kommt, wodurch Cre Fusionsproteine mit einer unvollständigen LBD entstehen können, die dann nicht mehr regulierend wirkt [126]. Die ermittelte Hintergrundaktivität des Cre-FRT-ERT2-FRT (regulierbar zu konstitutiv aktiv) und Cre-FRT-ERT2 Konstrukts (aus konstitutiv aktiv zu regulierbar) beträgt jeweils etwa drei Prozent derselben mit 4-OHT stimulierten Rekombinase. Die Induzierbarkeit der Hormon abhängigen Cre Expressionskonstrukte liegt verglichen mit den korrespondierenden konstitutiv aktiven Cre-FRT-NLS (aus regulierbar zu konstitutiv aktiv) bzw. Cre-FRT-NLS-FRT Kassetten (konstitutiv aktiv zu regulierbar) bei 60-70%. Das herkömmliche Expressionsplasmid pNNCre19-ER288-594, das eine Cre-ERT2 Rekombinase ohne FRT Sequenz exprimiert und zur Beurteilung des

Rekombinationshintergrunds parallel unter gleichen Bedingungen getestet worden ist, zeigt zwar im Vergleich zum konstitutiv aktiven pBKEF-NLSCre Kontrollvektor eine höhere Cre Aktivität nach Induktion, der Hintergrund allerdings ist mit fast sieben Prozent doppelt so hoch wie der von beiden bifunktionalen Cre-FRT-ERT2 Rekombinasen. Die hohe Aktivität der Kontrolle könnte auf die Verwendung des modifizierten Cre19 Proteins mit dem CMV (*human cytomegalovirus immediate-early gene*) Promotor zur Expression der Cre-ERT2 Kasette zurückgeführt werden, da Cre19 eine etwas höhere Rekombinationsaktivität als die Wildtyp Cre vermittelt [126]. Hintergrundaktivitäten bei nicht erfolgter Induktion mit dem Liganden wurden auch bei konventionellen Proteinen bestehend aus Fusionen von Cre mit der LBD des murinen Östrogenrezeptors (Mer) [100] oder mit mutierten humanen Östrogenrezeptor LBDs (ERT, ERT2) [111, 113] beobachtet. In einem Vergleich verschiedener Cre-Mer und Cre-ERT2 Fusionsproteine nach transienter Transfektion der entsprechenden Plasmide in Zellen der CV1-B5 Reporter Zelllinie und anschließender Bestimmung der Rekombinationsaktivität der Konstrukte anhand der relativen  $\beta$ -Galactosidase Aktivität wurden ähnliche Hintergrundwerte ermittelt wie für die generierten Cre-FRT-ERT2 Proteine [116]. Die *in vitro* beobachtete Hintergrundaktivität von Liganden induzierbaren Cre Fusionsproteinen konnte *in vivo* in Abwesenheit des Induktors nicht mehr detektiert werden [115].

Die Ergebnisse aus luminometrischen Untersuchungen zur Funktionsprüfung des jeweiligen Fusionsproteins zeigten, dass die Cre Rekombinase an ihrem C-Terminus mit einer ERT2 Domäne oder einem SV40 Kernlokalisierungssignal (NLS) [37] über das Translationsprodukt einer im gleichen Leseraster klonierten FRT Erkennungssequenz [23] fusioniert werden kann, ohne ihre Enzymaktivität zu verlieren.

### 3.1.5 Schlussfolgerung

In der Tabelle 3.1.1 werden zusammenfassend die Ergebnisse von allen induzierbaren Cre Expressionskonstrukten anhand ihres Signal-zu-Rausch Verhältnisses dargestellt.

Expressionskonstrukt	Signal-zu-Rausch Verhältnis
Cre-FRT-2xERT2-FRT	gut
Cre-FRT-3xERT2-FRT	schlecht
F5-ERT2-Cre-ERT2-FRT	schlecht
Cre-FRT-PR-ERT2-FRT	schlecht
Cre-FRT-ERT2-FRT (regulierbar zu konstitutiv aktiv)	sehr gut
Cre-FRT-ERT2 (aus konstitutiv aktiv zu regulierbar)	sehr gut

**Tabelle 3.1.1: Darstellung der Ergebnisse von induzierbaren Cre Expressionskonstrukten anhand des Signal-zu-Rausch Verhältnisses**

Aus den Ergebnissen geht hervor, dass mit den generierten neuen bifunktionalen Konstrukten aus multiplen mit Cre fusionierten LBDs von Hormonrezeptoren kein gutes Signal-zu-Rausch Verhältnis erzielt werden konnte, so dass keine dieser neuen bifunktionalen Fusionsrekombinasen zur Herstellung transgener Cre Mäuse geeignet ist. Die höchste konstitutive Cre Aktivität, die beste Induzierbarkeit der Hormon abhängigen Variante und im Verhältnis dazu der niedrigste Rekombinationshintergrund konnte mit den Expressionskonstrukten erzielt werden, die jeweils nur eine ERT2 Domäne am C-Terminus der Rekombinase enthalten. Dies trifft zum einen auf das bifunktionale Expressionskonstrukt zu, das von einer induzierbaren Cre-FRT-ERT2 Fusionsrekombinase nach FLP vermittelter Deletion der FRT flankierten ERT2 Domäne in ein konstitutiv aktives Cre-FRT-NLS Fusionsprotein umgeschaltet werden kann (regulierbar zu konstitutiv aktiv) [152]. Zum anderen zeigt das vergleichbare im Zuge der vorliegenden Arbeit generierte Konstrukt, das in seiner ursprünglichen Form das konstitutiv aktive Cre-FRT-NLS Protein exprimiert, welches durch die Deletion der FRT flankierten NLS Region in die Liganden induzierbare Cre-FRT-ERT2 Form umgeschaltet werden kann (konstitutiv aktiv zu regulierbar), eine effiziente Rekombination. Ein solches Konstrukt (konstitutiv aktiv zu regulierbar) würde gegenüber dem vergleichbaren Konstrukt (regulierbar zu konstitutiv aktiv) den Vorteil bieten, dass mit entsprechenden Mäusen ohne eine vorherige Induktion direkt eine gewebespezifische Inaktivierung eines konditionalen Allels erzielt werden könnte. Sollte zusätzlich auch eine temporale Funktionsanalyse eines konditionalen Allels von Interesse sein, könnte die korrespondierende die induzierbare Rekombinase exprimierende Cre Maus, die aus der Verpaarung der konstitutiv aktiven Cre Maus mit einer FLP oder FLPe *deleter* Maus [34, 83] resultieren würde, für Experimente eingesetzt werden.

### **3.1.6 Die Herstellung eines BAC Transgens mittels ET Rekombination**

Das bifunktionale Cre-FRT-ERT2-FRT Expressionskonstrukt wurde für die Herstellung eines Transgens zur Generierung einer Cre Maus, die die bifunktionale Kassette gewebespezifisch in Eosinophilen exprimieren soll, mittels ET Rekombination verwendet. Die Methode des ET Klonierens erlaubt eine *in vivo* Rekombination in Bakterien zwischen homologen DNA Fragmenten und basiert auf der Verwendung von viralen Rekombinationsenzymen, die über ein Plasmid in *E. coli* eingeschleust werden können [161]. In dieser Arbeit wurde die Methode eingesetzt, um ein PCR Produkt in ein genomisches Genfragment einzuführen. Die für die Rekombination nötigen homologen Bereiche wurden dem PCR Produkt über Oligonukleotide hinzugefügt. Das ET-Klonieren stellt ein Problem dar, wenn die Methode zur Mutagenese in Plasmiden mit einer hohen Kopienzahl pro Bakterienzelle eingesetzt wird. Weil nie alle in einer Zelle vorliegenden

Plasmide erfolgreich mutiert werden, ist die Wahrscheinlichkeit groß, dass die Kolonien aus einer Mischung des ursprünglichen und mutierten Plasmids bestehen. Weil BACs nur in einer Kopie pro Bakterienzelle vorliegen, tritt dieses Problem bei der Mutagenese eines BAC nicht auf. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit zur Insertion der bifunktionalen Cre-FRT-ERT2-FRT Konstruktsequenz zusammen mit der attP/attB flankierten Selektionskassette in das Initiationscodon des für die Eosinophile Peroxidase kodierenden *Epx* Gens der BAC verwendet, der das genomische Fragment enthält. Für die homologe Rekombination muss ein Bereich der genomischen Sequenz ausgewählt werden, der keine repetitiven Elemente enthält, weil es sonst zu Integrationen des PCR Produkts in nicht vorgesehene Loci führen könnte. Wird ET Klonierung für die Modifizierung eines BACs verwendet, kann zur Identifizierung von positiven Klonen nach erfolgter Rekombination auf den integrierten Selektionsmarker selektioniert werden. Um das Auftreten falsch positiver Klone auszuschließen, wurde als PCR Matrize der pMOD™4 Vektor, in den die Cre Kassette kloniert worden ist, verwendet, weil er sich nicht in dem *E. coli* Wirtstamm DH10B, der den BAC enthält, replizieren kann. Trotzdem konnten nach der Rekombinationsreaktion auf Kontrollplatten auch Bakterienklone identifiziert werden, die aus Transformationsansätzen hervorgegangen sind, die nicht zur Aktivierung der Rekombinationsproteine induziert worden sind. Auch die empfohlene Kolonien-PCR zur Verifizierung einer erfolgreichen Insertion der Cre Kassette in das ATG Codon des Zielgens war nicht eindeutig, so dass mittels Southern Blot die bisherigen Ergebnisse bestätigt werden müssen, bevor das BAC Transgen zur Generierung von transgenen Cre Mäusen eingesetzt werden kann.

#### 3.1.7 Ausblick

Die Funktionsprüfung der induzierbaren F5-ERT2-Cre-FRT-ERT2 und der korrespondierenden konstitutiv aktiven F5-Cre-FRT-NLS Fusionsrekombinase ergab eine sehr schwache Cre Aktivität, die auf das Vorhandensein der F5 Erkennungssequenz im 5' kodierenden Bereich direkt stromabwärts des Initiationscodons zurückgeführt wird. Es wird angenommen, dass aufgrund dieses Elements entweder die Transkription oder Translation beider Fusionsvarianten beeinflusst wird. Um festzustellen, ob die Expression der Rekombinasen auf RNA oder Protein Ebene inhibiert wird, müssen Zellen, die mit den entsprechenden Expressionsplasmiden transfiziert wurden, mittels Northern und Western Blot auf Cre RNA bzw. Protein Expression untersucht werden. Die Gesamt RNA bzw. Proteine sollten für diese Experimente nur aus Zellen isoliert werden, die erfolgreich ein Cre Plasmid aufgenommen haben. Dadurch soll sichergestellt werden, dass genügend Cre RNA bzw. Protein für Analysen zur Verfügung steht, weil in initialen Experimenten

festgestellt wurde, dass die Cre RNA bzw. Protein Ausbeute für Analysen zu gering ist, wenn alle Zellen aus der Transfektionsreaktion zur Aufarbeitung eingesetzt werden.

Das bifunktionale Cre-FRT-ERT2-FRT Expressionskonstrukt wurde aufgrund seiner effizienten Rekombinationsleistung zur Herstellung eines *Epx* BAC Transgens mittels ET Rekombination eingesetzt, um eine transgene Cre Maus zu erzeugen, die von der Expression einer gewebespezifisch Hormon induzierbaren Rekombinase durch FLP vermittelte Rekombination in eine gewebespezifisch konstitutiv aktive Rekombinaseform umgeschaltet werden kann. Dazu wurde die Cre Kasette in das Initiationscodon der für die Eosinophile Peroxidase kodierenden Sequenz inseriert, um eine Eosinophile spezifische Expression des Cre Fusionsproteins zu ermöglichen. Da bislang mit Hilfe der Kolonien-PCR kein eindeutiger Beweis für eine erfolgreiche Integration der Cre Kasette in den *Epx* Locus eines vermeintlich positiven BAC Klon erbracht werden konnte, soll zum Nachweis mit der BAC DNA ein Southern Blot und eine Hybridisierung mit einer spezifischen DNA Sonde erfolgen. Kann der Klon als positiv identifiziert werden, soll das BAC Transgen anschließend zur Generierung einer Eosinophile spezifischen Cre Maus eingesetzt werden.

Weil auch die neu generierte bifunktionale Cre Expressionskasette (konstitutiv aktiv zu regulierbar) mit nur einer ERT2 Domäne, die zuerst ein konstitutiv aktives und FLP Rekombinase vermittelt ein induzierbares Fusionsprotein exprimiert, ein gutes Signal-zu-Rausch Verhältnis zeigte, soll sie parallel zur Herstellung eines *Epx* BAC Transgens verwendet werden. Der Vorteil dieser Kasette gegenüber der zuerst induzierbaren Kasette ist, dass sie die Generierung von Mäusen erlaubt, die direkt eine gewebespezifische Expression der Cre-NLS Rekombinase erlauben. Falls die Rekombinase Aktivität für induzierbare Experimente zusätzlich temporal beschränkbar sein soll, können diese Mäuse mit einer FLPe *deleter* Maus verpaart werden, um eine korrespondierende induzierbare Mauslinie zu erhalten.

#### 3.2 Co-Expression von Genen mittels 2A "CHYSEL" Technologie

Neben den bifunktionalen Cre Expressionsplasmiden wurden zwei bicistronische Vektoren generiert, die eine koordinierte Co-Expression einer NLS-Cre Fusionsrekombinase und eines eGFP (*enhanced green fluorescent protein*) Markers in einem äquimolekularen Verhältnis ermöglichen sollen. Die Co-Expression beider Gene von einem Plasmid beruht auf der Verbindung der kodierenden Sequenzen im gleichen Leseraster durch ein 2A Peptid, das als "CHYSEL" (*cis-acting hydrolase element*) bezeichnet wird, wobei das N-terminale Protein das 2A Peptid als C-terminalen Bestandteil enthält [93]. Um zu untersuchen, ob die Cre Funktionalität durch das

2A Peptid beeinflusst wird, wurden die Plasmide in zwei Ausführungsvarianten hergestellt. In der einen Ausführung wird die N-terminale NLS-Cre Rekombinase zusammen mit dem 2A Peptid exprimiert und in der zweiten Ausführung erfolgt die Expression des C-terminalen NLS-Proteins ohne das 2A Peptid, da hier die eGFP kodierende Sequenz den N-terminalen Teil darstellt. Die Cre Aktivität beider Plasmidvarianten wurde dann mit der von einem konventionellen Cre Expressionsplasmid verglichen.

Die Ergebnisse zeigten im Vergleich zu der konventionellen NLS-Cre Kontrolle eine sehr ähnliche Aktivität beider von dem jeweiligen bicistronischen Plasmid exprimierter Fusionsrekombinasen, was beweist, dass ein 2A Peptid am C-Terminus eines Proteins die Funktionalität desselben nicht beeinflusst.

Da eine Co-Expression von einem Cre und einem Marker Protein mit Hilfe der 2A "CHYSEL" Technologie möglich ist, könnten vergleichbare Cre Konstrukte zur Generierung von transgenen Cre Mäusen verwendet werden, wenn sowohl die Co-Expression der Rekombinase als auch des endogenen Gens, in das das Transgen inseriert wurde, in äquimolekularen Mengen sichergestellt werden soll. Bislang werden für diese Zwecke IRES Elemente in Konstrukten zur Herstellung transgener Cre Mäuse eingesetzt [90, 91], die allerdings den Nachteil haben, dass nach Integration des Transgens die Expression der 3' gelegenen kodierenden Sequenz für gewöhnlich schwächer ist als die der 5'-Sequenz [92]. Das führt dazu, dass die Proteine nicht in einem äquimolekularen Verhältnis gebildet werden, sondern dass ein Überschuss des N-terminalen Proteins entsteht, was zur Folge haben kann, dass die Expressionsmenge für die Wirksamkeit des Transgens nicht ausreichend ist [92]. Mit der Herstellung von transgenen Cre Mäusen unter Verwendung der neuen 2A "CHYSEL" Technologie könnte dieses Problem bewältigt werden.

### 3.3 Induzierbare NMD Kassetten zur konditionalen Mutagenese

Der zweite Teil der vorliegenden Arbeit beschreibt die Herstellung von induzierbaren NMD (*nonsense mediated mRNA decay*) Kassetten, die als Bestandteil von *gene targeting* und *gene trapping* Konstrukten sowohl zur gezielten als auch ungerichteten konditionalen Mutagenese von Genen eingesetzt werden können. Die Funktion der generierten induzierbaren NMD Kassetten beruht auf dem Einsatz NMD vermittelnder Exons, in die Stopcodons in alle drei Leseraster eingeführt wurden. Wird eine induzierbare NMD Kassette in Transkriptionsrichtung in ein beliebiges Zielgen inseriert, so wird eines der drei Stopcodons als prämaures Terminationscodon (PTC) erkannt, die mRNA wird dem NMD Prozess zugeführt und degradiert, wodurch das Gen inaktiviert wird [149].

Als NMD vermittelnde Exons einer induzierbaren NMD Kasette wurden neben einem Exon des  $\beta_7$ -Integrin (itgb7) Gens drei verschiedene Exons des humanen Retinoblastom (RB1) Gens jeweils mit für die Funktionalität des Exons nötigen 5'- und 3'-Intronsequenzen eingesetzt. Um eine konditionale Inaktivierung eines beliebigen Zielgens zu ermöglichen, wurden die NMD Kassetten mit mutierten Rekombinase Erkennungssequenzen in entgegengesetzter Orientierung versehen. Mittels Cre oder FLP vermittelter Rekombination an den lox71/66 bzw. FRT LE/RE Zielsequenzen [42, 44] kann eine Inversion der Kasette erzielt werden, um den Aktivitätszustand eines Zielgens mehrfach zu ändern. Ein betroffenes Gen kann so in Abhängigkeit von der Orientierung der NMD Kasette z.B. zunächst inaktiviert und anschließend konditional reaktiviert werden (Abbildung 2.3.1). Als Beispiel für ein zu inaktivierendes Gen wurde das *firefly* Luciferase Gen gewählt, das in dem pGL2luc-lambdaIn2 Vektor durch ein Intron aus dem *lambda2* Gen der Maus in zwei Exons geteilt vorliegt. Für Funktionsanalysen wurden NMD Kassetten jeweils in beiden Orientierungen in das Intron des Luciferase Plasmids kloniert. Liegt das NMD Exon im kodierenden Strang vor, wird eine NMD vermittelte Degradierung des Transkripts eingeleitet, so dass keine Luciferase Expression erfolgen sollte. Im Gegensatz dazu sollte das im nicht kodierenden Strang lokalisierte NMD vermittelnde Exon keinen Einfluss auf die Luciferase Expression haben (Abbildung 2.3.2).

### 3.3.1 Die durch NMD Kassetten induzierte Inaktivierung der Luciferase Aktivität kann mittels Dual-Luciferase® Reporter Assay System bestimmt werden

Zur Prüfung der Wirksamkeit der NMD Kassetten wurden die hergestellten NMD Vektoren transient in die Zellen der A293 Linie transfiziert, die anschließend auf Luciferase Aktivität mittels Dual-Luciferase® Reporter (DLR™) Assay System untersucht wurden. Als Kontrolle diente das pGL2luc-lambdaIn2 Luciferase Plasmid.

Wie vom Hersteller angegeben, liegen die Vorteile des DLR™ Systems, das zur Messung der *firefly* und *Renilla* Lumineszenz in einer Probe verwendet werden kann, in der Reduzierung der Unterschiede, die zwischen Proben innerhalb eines Experiments und zwischen Experimenten, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt wurden, auftreten können. Die Schwierigkeit bei der Durchführung von Reporter Assays auf Multilochplatten besteht darin, eine möglichst einheitliche Zelldichte und Überlebensrate in allen Proben einzuhalten und die Transfektion reproduzierbar durchzuführen. Unterschiede in Verbindung mit Multilochplatten ergeben sich durch die Wärmeentwicklung und den Feuchtigkeitsgehalt in den einzelnen Löchern. Dem Hersteller nach kann das DLR™ System diese Unterschiede ausgleichen, wodurch ein präziser und aussagekräftiger Vergleich zwischen einzelnen Proben ermöglicht wird. Trotzdem konnte

mit dem DLR™ System eine Streuung innerhalb der Messwerte aus unterschiedlichen unabhängigen Transfektionen beobachtet werden, die zu verschiedenen Zeitpunkten erfolgt sind. Die beobachteten Unterschiede in den Messergebnissen werden wegen der Instabilität der *firefly* Luciferase auf die Zeitspanne zwischen Zellyse und Lumineszenzmessung, auf das Stadium der Zellen während der Transfektion sowie auf die Anzahl von erfolgten Passagen vor der Transfektion zurückgeführt. Wie beim Dual-Light® System können demnach auch beim DLR™ System jeweils nur Messwerte aus einem Transfektionsexperiment miteinander verglichen werden.

### **3.3.2 NMD Kassetten zeigen Unterschiede in der Wirkung der NMD vermittelnden Exons auf die Luciferase Aktivität**

Im Fall der im kodierenden Strang lokalisierten auf dem  $\beta_7$ -Integrin Exon 14 basierenden itgb7 NMD Kasette konnte eine Restaktivität der Luciferase ermittelt werden, die für eine unvollständige Degradierung der Reporter mRNA und somit unvollständige Geninaktivierung spricht, die in der Entstehung hypomorpher Mutanten resultieren könnte [13, 130]. Als Ursache für diese Beobachtung wird alternatives Spleißen angenommen, bei dem das NMD vermittelnde Exon aus einigen Primärtranskripten herausgeschnitten wird, so dass es keine inaktivierende Wirkung auf das Luciferase Gen ausüben kann. Selbst wenn die Luciferase mRNA nicht dem NMD Prozess unterliegen würde, könnte ein solches Transkript, das ein als NMD Kasette wirkendes Exon enthält, aufgrund von drei in das Exon eingeführten Stopcodons für kein funktionelles Luciferase Protein kodieren. Alternatives Spleißen des Exon 14  $\beta_7$ -Integrin Gens ist tatsächlich nachgewiesen und in der Datenbank für alternative Spleißvarianten (*Alternative Splicing Database*) [184] annotiert worden. Bei murinen  $\beta_7$ -Integrin Transkripten kann demnach ein Spleißen von Exon 13 auf Exon 15 erfolgen, wodurch das Exon 14 zusammen mit den stromabwärts und stromaufwärts gelegenen Introns 13 und 14 aus dem Primärtranskript entfernt wird. Liegt die Kasette dagegen in entgegengesetzter Orientierung, also im nicht kodierenden Strang vor, sollte sie durch endogenes Spleißen aus dem Primärtranskript entfernt werden, wodurch die normale Genexpression wiederhergestellt wird. Da jedoch eine Reduktion der Luciferase Aktivität im Vergleich zur Kontrolle ohne eine inserierte NMD Kasette beobachtet werden konnte, wird angenommen, dass das Herausspleißen der Kasette nicht vollständig ist. Als Folge könnten Transkripte entstehen, die zwar aufgrund der Orientierung des NMD vermittelnden Exons nicht degradiert werden, aber für ein eingeschränkt funktionsfähiges Luciferase Protein kodieren.

Eine der RB1 NMD Kassetten, die auf dem Exon 18 des Retinoblastom Gens basiert, konnte ebenfalls nur eine unvollständige Zielgen Inaktivierung auslösen. Entweder stellen die eingeführten Stopcodons keine wirkungsvollen PTCs dar, so dass der NMD Prozess



nicht induziert werden kann oder alternatives Spleißen spielt auch hier eine Rolle. Die Kassetten, die auf den Exons 16 und 23 basieren, induzierten eine nahezu vollständige Luciferase Inaktivierung, aber im nicht kodierenden Strang lokalisiert, inhibierte die RB1-16 NMD Kasette die Reporter Aktivität wesentlich stärker als die RB1-23 Ausführungsform. Daraus geht hervor, dass das Herausspleißen der RB1 NMD Kassetten ebenfalls nicht vollständig ist und zusätzlich in Abhängigkeit von den Sequenzen variiert. Werden die *itgb7* und die RB1-23 NMD Kassetten mit Rekombinase Erkennungssequenzen flankiert, um durch Inversion der Kasette den Aktivitätszustand eines Zielgens ändern zu können, konnte verglichen mit der korrespondierenden Kasette ohne flankierende Sequenzen eine Verringerung in ihrer NMD vermittelnden Wirkung beobachtet werden. Dieser Effekt wird auf das Vorhandensein der fast identischen gegensätzlich orientierten Erkennungssequenzen am 5' und 3' Ende der Kasette zurückgeführt (siehe Abbildung 2.3.4 und 2.3.7). Solche palindromen Sequenzen in einem Molekül führen oft zu intramolekularen Basenpaarungen, die eine Haarnadelstruktur bilden. Demnach gehen die flankierenden Erkennungssequenzen miteinander eine Bindung ein, wodurch eine Doppelhelix entsteht, die am Ende durch eine Schleife abgeschlossen wird, die die Sequenz der NMD Kasette enthält. Die Entstehung einer solchen RNA-Haarnadelstruktur hat zur Folge, dass das NMD vermittelnde Exon seine inaktivierende Wirkung auf die Luciferase nicht ausüben kann, weil die Struktur durch den Spleißvorgang aus dem Primärtranskript entfernt wird. Auf diese Weise erfolgt keine NMD vermittelte Degradierung von allen Luciferase Transkripten, was in einer Restaktivität des Reporters resultiert. Auf der anderen Seite scheint das Herausspleißen der RB1-23 NMD Kasette im nicht kodierenden Strang durch die Erkennungssequenzen und die damit zusammenhängende mögliche Bildung einer Haarnadelstruktur effizienter abzulaufen, so dass nur solche mRNAs entstehen, die für funktionsfähige Luciferase Proteine kodieren. Warum dieser Effekt nur mit der RB1-23-me-frt-lox NMD Kasette und nicht auch mit der *itgb7*-me-frt-lox NMD Kasette beobachtet werden konnte, ist unklar. Da die Entstehung einer Haarnadelstruktur auch von der Schleifenlänge abhängt, könnte aufgrund der längeren Sequenz des *itgb7* Exons und der Intronsequenzen eine vergleichbare Struktur gebildet werden, die jedoch instabiler ist und schneller zerfällt, wodurch sie nicht zu einem effizienten Herausspleißen der NMD Kasette beitragen kann.

Um die Entstehung solcher RNA-Haarnadelstrukturen zu verhindern, könnten induzierbare NMD Kasette zur konditionalen Mutagenese entsprechend der "FLE<sub>x</sub>" *switch* Inversionsmethode modifiziert werden [53, 137]. Die Rekombinase Erkennungssequenzen flankieren in dem Fall eine NMD Kasette nicht als geschachtelte Paare, sondern als paarweise ineinander geschachtelte Sequenzen. Da die Abfolge der flankierenden Erkennungssequenzen am 5'-und 3'-Ende eines DNA Moleküls in dieser

Variante nicht identisch sondern versetzt ist, wäre die Wahrscheinlichkeit für eine Basenpaarung weitaus geringer. Um die NMD Kassetten umzugestalten, müsste ein völlig neues Fragment synthetisiert werden, das die Erkennungssequenzen in der "FLE<sub>x</sub>" *switch* Strategie geeigneten Anordnung beinhaltet. Eine solche Modifizierung der NMD Kassetten wäre in der Synthese aufwendig, während der Klonierungsaufwand relativ gering wäre. Dazu müsste zuerst das Fragment mit "FLE<sub>x</sub>" *switch* geeigneten Erkennungssequenzen in die Intronsequenz des pGL2luc-lambdaIn2 Vektors kloniert werden. Anschließend würde die Klonierung der bereits vorliegenden NMD Kassetten ohne flankierende Sequenzen in beiden Orientierungen in das "FLE<sub>x</sub>" Fragment erfolgen, so dass die Kasette von Erkennungssequenzen flankiert vorliegen würde. Der Nachteil einer solchen gegenüber der generierten Kasette wäre die Anzahl der Rekombinase Erkennungssequenzen [137]. Um mit diesem System eine erneute Inversion der Kasette zu verhindern, muss in einer zweiten Rekombinase vermittelten Reaktion eine der zurückbleibenden Erkennungssequenzen deletiert werden. Da hierfür ein Mindestabstand zwischen den Rekombinase Zielsequenzen notwendig ist [74], wäre eine "FLE<sub>x</sub>" *switch* geeignete NMD Kasette größer als die bisherigen Varianten.

#### **3.3.3 Rekombinase Erkennungssequenzen beeinflussen die NMD vermittelnde Wirkung der NMD Kassetten**

Um zu untersuchen, ob jede Erkennungssequenz den gleichen Einfluss auf die Reduzierung der inaktivierenden Wirkung eines NMD vermittelnden Exons hat, wurden Konstrukte erzeugt, in denen die RB1-23 NMD Kasette jeweils nur von einer Erkennungssequenz flankiert vorliegt und in beiden Orientierungen in das Intron des als Testsystem dienenden pGL2luc-lambdaIn2 Vektors kloniert. Die Untersuchung der Luciferase Aktivität erfolgte ebenfalls in Zellen der A293 Linie, die mit den entsprechenden Plasmiden transient transfiziert worden sind. Es wurde erwartet, dass eine einzelne flankierende Rekombinase bzw. Transposase Zielsequenz keinen großen Einfluss auf die Wirkung der NMD Kasette haben sollte [57] und dass die Bildung einer Haarnadelstruktur als Ursache für eine Reduktion der NMD vermittelnden Wirkung hier aufgrund der relativ kurzen palindromen Sequenzen im Verhältnis zur NMD Kassetten Sequenz, die die Schleife bilden würde, sehr unwahrscheinlich ist. Anhand der mittels DLR™ System bestimmten Luciferase Aktivitäten konnte jedoch festgestellt werden, dass jede der drei unterschiedlichen Erkennungssequenzen, die die RB1-23 NMD Kasette flankieren, ihre NMD vermittelnde Wirkung beeinträchtigt. Die höhere Aktivität der Luciferase in Zellen, die mit dem pGL2luc-RB1-lox (-) NMD Vektor transient transfiziert wurden, verglichen mit der Reporter Aktivität in den mit der pGL2luc-lambdaIn2 Kontrolle transfizierten Zellen ist möglicherweise auf die Qualität der Plasmid DNA zurückzuführen.

Um den beobachteten Effekt zu bestätigen, müssen weitere transiente Transfektionen mit einer neu hergestellten pGL2luc-RB1-lox (-) Plasmid DNA erfolgen. Für die Unterschiede in der beobachteten Luciferase Aktivität zwischen den einzelnen Kassetten konnte bislang keine Erklärung gefunden werden. Es kann nur vermutet werden, dass die unterschiedlichen Längen und Basenabfolgen der flankierenden Erkennungssequenzen für die Funktionalität eines NMD vermittelnden Exons eine wichtige Rolle spielen und jede zusätzliche Sequenz am 5' und 3' Ende der Kasette ihre Leistungsfähigkeit beeinflusst. Ob diese Problematik durch eine Modifizierung der NMD Kasette entsprechend der "FLEX" switch Inversionsmethode bewältigt werden kann, bleibt abzuwarten.

#### **3.3.4 Kombinierte induzierbare NMD polyA Kassetten zeigen keine verbesserte NMD vermittelnde Wirkung**

Die beschriebenen Ausführungsformen der auf  $\beta_7$ -Integrin bzw. Retinoblastom Gen basierenden NMD Kassetten beinhalten nur das NMD vermittelnde Exon als Signal zur Auslösung des NMD Prozesses. Dies kann dazu führen, dass die Kassetten durch alternatives Spleißen aus der prä-mRNA entfernt werden, so dass nach erfolgter Prozessierung eine reife mRNA entsteht, die für ein unverändertes Protein kodiert, was eine unvollständige Inaktivierung des betreffenden Zielgens zur Folge hat [13, 130]. Um dieses mögliche Problem zu beheben, wurden NMD Kassetten generiert, die neben dem NMD vermittelnden Retinoblastom Exon 23 auch ein terminales Exon mit polyA Signal enthalten, das als zweites notwendiges Signal zum Auslösen von NMD dient [170]. Weil die meisten polyA Signale jedoch die Eigenschaft besitzen, in beiden Orientierungen als Polyadenylierungssignal wirken zu können, sind sie für die NMD Kasette ungeeignet. Deshalb wurde für die Herstellung der kombinierten NMD Kassetten das polyA Signal des Kaninchen  $\beta$ -Globin Gens ausgewählt, für das Unidirektionalität beschrieben wurde [173]. Die Kassetten wurden in einer langen Ausführungsform polyA 1, bestehend aus dem RB1 Exon 23 sowie der kompletten  $\beta$ -Globin Intron 2 und Exon 3 Sequenz und in einer kürzeren Variante polyA 2 hergestellt, die das Intron 1 sowie die unvollständige  $\beta$ -Globin Exon 3 Sequenz enthält. Um ihre Wirkweise zu untersuchen, wurden sie jeweils in beiden Orientierungen in den Testvektor pGL2luc-lambdaIn2 kloniert und in die Zellen der A293 Zelllinie transfiziert. Anhand der mit Hilfe des DLR™ Systems ermittelten Zielgen Aktivitäten konnte festgestellt werden, dass die Luciferase inaktivierende Wirkung der polyA 2 NMD Kasette, wenn sie im kodierenden Strang lokalisiert vorliegt, nur unwesentlich stärker war als die der RB1-23 Kasette. Gleichzeitig konnte mit der langen polyA 1 NMD Kasette sogar eine etwas schwächere inaktivierende Wirkung der polyA 1 NMD Kasette beobachtet werden, die wahrscheinlich auf die Gesamtlänge der Kasette zurückzuführen ist. Das zusätzliche polyA Signal hat also nur einen geringen Einfluss auf

die Wirkung der bisherigen NMD Kasette zur Inaktivierung der Luciferase. Mit der Kasette im nicht kodierenden Strang, wo sie eigentlich keinen Einfluss auf die Luciferase Aktivität haben sollte, wurde jedoch eine starke Beeinträchtigung der Reporter Aktivität festgestellt. Das vermeintlich unidirektionale polyA Signal des Kaninchen  $\beta$ -Globin Gens wirkt demnach auch teilweise in der anderen Orientierung, wodurch es zu einer vorzeitigen Termination der Transkription kommt. Das verkürzte Transkript kodiert dann nur noch für ein unvollständiges und inaktives Luciferase Protein. Im Fall der langen Version der kombinierten polyA Kasette konnte eine stärkere durch vorzeitige Transkriptionstermination hervorgerufene Luciferase Inaktivierung festgestellt werden als mit der polyA 2 Variante. Das kürzere Fragment aus sechs Nukleotiden stromaufwärts und 94 nt stromabwärts des  $\beta$ -Globin polyA Signals, das für die unidirektionale Wirkung des Signals als ausreichend beschrieben wurde [174], kann möglicherweise zumindest die im Zusammenhang mit der NMD Kasette beobachteten bidirektionalen Eigenschaften des Kaninchen  $\beta$ -Globin polyA Signals verringern.

#### **3.3.5 Nur lox66/71 aber nicht FRT LE/RE Rekombinase Zielsequenzen sind für Inversionsstrategien geeignet**

Der Nachweis für die *in vivo* Funktionalität der mutierten lox66/71 und FRT LE/RE Erkennungssequenzen [42, 44] für die jeweilige Rekombinase erfolgte durch Transformation der NMD Plasmide in einen Cre bzw. FLP exprimierenden *E. coli* Stamm (294-Cre bzw. 294-FLP) [155] und anschließende Restriktionsanalysen zum Nachweis einer Inversion. Weil die Aktivierung und Inaktivierung einer NMD Kasette zur konditionalen Mutagenese in murinen embryonalen Stammzellen und anderen eukaryotischen Zellen von der Expression und Rekombinationsaktivität der Cre und FLP Rekombinase abhängt und keine zusätzlichen Co-Faktoren benötigt, reicht das Experiment zum funktionellen Nachweis der *in vivo* Inversion aus. In transgenen Mäusen würde eine Inaktivierung oder Reaktivierung eines Zielgens, in das eine induzierbare NMD Kasette eingeführt wurde, durch einer Inversion der NMD Kasette nach einer Verpaarung mit Cre bzw. FLP deleter Mäusen erfolgen [34, 83, 185]. Auch eine gewebespezifische und/oder zeitspezifische Inversion der Kasette und daraus resultierende Änderung des Aktivitätszustands eines Zielgens wäre möglich durch die Verpaarung mit entsprechenden Cre bzw. FLP transgenen Mäusen [84, 85, 95, 122]. Während durch Analysen von Verdaureaktionen gezeigt werden konnte, dass die Cre vermittelte Inversion der NMD Kassetten an den lox66/71 Mutanten sehr effizient stattfindet, wurde im Gegensatz dazu festgestellt, dass an den verwendeten FRT LE/RE Erkennungssequenzen keine Inversionsreaktion erfolgt. Da mit den 294-FLP Bakterien bereits erfolgreich sowohl Wildtyp als auch F5 flankierte DNA Moleküle deletiert werden

konnten, können die Bakterien als Ursache für die nicht erfolgte Rekombinationsreaktion ausgeschlossen werden. Viel mehr liegt die Erklärung in den FRT LE/RE Sequenzen selbst. Offensichtlich kann an diesen mutanten Erkennungssequenzen, die als für stabile Insertions- als auch Inversionsreaktionen geeignet beschrieben wird [26], keine Inversion erfolgen. Da diese die NMD Kasette flankierende Erkennungssequenzen nicht funktionell sind, müssten sie durch andere FRT Mutanten ersetzt werden, an denen eine Inversionsreaktion stattfinden kann, um ein NMD Kasette auf die beschriebene Weise zur konditionalen Mutagenese einsetzen zu können (Abbildung 2.3.1). Eine solche FLP Rekombinase Zielsequenz ist z.B. die mutante F3 Sequenz [49], die in der "FLE<sub>x</sub>" *switch* Strategie erfolgreich für Inversionen von DNA Molekülen eingesetzt wird [137]. Soll die Kasette zwei gerichtete Inversionsreaktionen und somit Änderungen des Aktivitätszustands erlauben, muss sie entsprechend der "FLE<sub>x</sub>" *switch* Inversionsmethode modifiziert werden.

### 3.3.6 Schlussfolgerung

Die Ergebnisse aus luminometrischen Messungen zur Analyse der Aktivität des *firefly* Luciferase Reporters zeigten, dass die NMD vermittelnden Exons in Abhängigkeit von ihrer Sequenz eine mehr oder weniger effiziente Degradierung des Zielgens einleiten können. Die Anforderungen an eine NMD Kasette, im kodierenden Strang eine effiziente NMD vermittelte Inaktivierung eines Zielgens zu induzieren und die Reportergen Aktivität möglichst unbeeinflusst zu lassen, wenn sie im nicht kodogenen Strang lokalisiert ist, konnten nur von der Retinoblastom Exon 23 basierten NMD Kasette erfüllt werden.

### 3.3.7 Emetine führt zum Zelltod von ES-Zellen

Neben transienten Transfektionsexperimenten sollte die NMD vermittelnde Wirkung der generierten RB1-23-lox NMD Kasette nach stabiler Transfektion des entsprechenden NMD Plasmids, das die Kasette im kodierenden (+) bzw. im nicht kodierenden Strang des *firefly* Luciferase Reporters enthält, anhand der Luciferase Aktivität untersucht werden. Dazu wurde zuerst eine *Renilla* Luciferase Reporter Zelllinie durch stabile Transfektion eines *Renilla* Plasmids mit einem Hygromycin Selektionsgen in ES-Zellen erzeugt, um eine Quantifizierung der *firefly* Luciferase nach Integration der NMD Konstrukte zu ermöglichen. Aus neun Hygromycin resistenten Klonen, die eine *Renilla* Aktivität zeigten, wurde ein Klon für die stabile Transfektion mit den NMD Plasmiden ausgewählt. Zur Selektion von ES-Zellklonen, bei denen eine Integration des Konstrukts ins Zellgenom erfolgt ist, wurde in beide NMD Plasmide direkt stromabwärts der lox66/71 [42] flankierten NMD Kasette jeweils in beiden Orientierungen eine attP/attB flankierte Neomycin Resistenzkasette kloniert, die mittels  $\phi$ C31 vermittelter Rekombination

deletiert werden kann [63]. Dadurch sollte zusätzlich untersucht werden, ob die Orientierung eines Resistenzmarkers für die Wirkung einer NMD Kasette eine Rolle spielt. Die stabile Transfektion erfolgte mit vier pGL2luc-RB1-23-lox-neo NMD Plasmiden, die das NMD vermittelnde Exon und das Resistenzgen in derselben bzw. gegensätzlichen Orientierung enthalten. Mittels Southern Blot konnte gezeigt werden, dass die stabile Transfektion erfolgreich war, weil die identifizierten Hygromycin und G418 resistenten Klone mindestens eine Kopie des NMD Konstrukts ins Genom integriert haben.

Die Bestimmung der *firefly* Luciferase Aktivität in den isolierten NMD Klonen dagegen war erfolglos. Aufgrund des SV40 Promotors, der die Expression des *firefly* Luciferase Reportergens unabhängig von der Insertionsstelle des Konstrukts kontrolliert, wurde erwartet, dass die Klone, die das NMD vermittelnde RB1-23\* Exon im nicht kodierenden Strang enthalten, neben der *Renilla* auch eine *firefly* Luciferase Aktivität aufweisen. Im Gegensatz dazu sollte in den Klonen, die das NMD Exon im kodierenden Strang enthalten, wegen dessen inaktivierenden Wirkung keine *firefly* Luciferase Aktivität nachweisbar sein. Die luminometrische Untersuchung der Klone ergab zwar eine *Renilla* Aktivität, aber in keinem der NMD Klone konnte eine *firefly* Luciferase Aktivität nachgewiesen werden. Ebenfalls keine Luciferase Aktivität wurde für die Klone, die aus der Transfektion der Zellen der *Renilla* Reporter Zelllinie mit den pGL2luc-RB1-23-lox-neo (+/+) und (+/-) Plasmiden hervorgegangen sind, wegen der NMD vermittelnden und somit inaktivierenden Orientierung der Kasette erwartet. Da jedoch auch mit der NMD Kasette in der nicht aktiven Orientierung keine Luciferase Aktivität festgestellt werden konnte, kann weder die Wirkung der NMD Kasette noch die Orientierung der Neomycin Selektionskasette auf den NMD Prozess beurteilt werden. Dass der *firefly* Reporter in keinem Klon aktiv ist, hängt vermutlich mit dem SV40 Promotor und der zur Linearisierung der NMD Vektoren gewählten Restriktionsschnittstelle zusammen. Um die Plasmide zu linearisieren wurden sie mit dem *KpnI* Restriktionsenzym verdaut, dessen spezifische Basensequenz direkt stromaufwärts des SV40 Promotors und der Luciferase Exons mit der darin lokalisierten NMD Kasette liegt (Abbildung 2.3.9). Möglicherweise wurde wegen der sehr geringen Distanz zwischen dem 5' Ende des Konstrukts und dem Promotor nur eine beschädigte oder unvollständige Promotor Sequenz mit dem Rest des Konstrukts ins ES-Zellgenom integriert. Solch ein defekter Promotor kann die Expression des *firefly* Luciferase Reportergens nicht mehr regulieren, was dazu führt, dass die Luciferase Aktivität in keinem der Klone nachgewiesen werden kann.

Das Fehlen der mRNA von Zielgenen, die PTCs enthalten, ist ein Hinweis auf ihre Degradierung durch den *nonsense mediated mRNA decay* Prozess. Zum Nachweis, dass die Inaktivierung der Luciferase Aktivität auf der Degradierung der Transkripte durch ein NMD vermittelndes Exon beruht, wurden die identifizierten NMD Klone in einem initialen

Experiment zur Hemmung des NMD Prozesses mit Emetine inkubiert, das ein effektiver Inhibitor der Protein Synthese in Eukaryoten ist. Durch eine Emetine vermittelte Inhibierung des NMD Prozesses können Transkripte von Zielgenen mit PTCs nicht mehr erkannt und degradiert werden [176]. Lassen sich Luciferase Transkripte in mit Emetine kultivierten Zellklonen nachweisen, wenn gleichzeitig keine Luciferase RNA in denselben Zellklonen ohne den Inhibitor aufgezeigt werden kann, kann die Inaktivierung der Luciferase Aktivität damit begründet werden, dass eine generierte NMD Kasette in Transkriptionsrichtung NMD induziert, wodurch das PTC markierte Luciferase Transkript degradiert wird. Die Inkubation der ES-Zellklone mit 100 µg/ml Emetine im ES-Zellkulturmedium führte bereits nach einer Stunde zu einem einsetzenden Absterben der Zellklone, nach vier Stunden hatten sich alle Zellen vom Plattenboden der Zellkulturschale gelöst und schwammen frei im Nährmedium, so dass keine Analyse auf das Vorhandensein der Luciferase mRNA erfolgen konnte. Der Zelltod könnte auf eine für ES-Zellen eventuell zu hohe Emetine Konzentration zusammen mit Apoptose induzierenden Eigenschaften von Emetine zurückzuführen sein [186]. Es müsste untersucht werden, ob auch mit niedrigeren Emetine Konzentrationen, die nicht zum Absterben der ES-Zellklone führen, oder kürzeren Inkubationsphasen eine effiziente Hemmung des NMD Prozesses möglich ist und eine Luciferase Expression nachgewiesen werden kann. Mit murinen embryonalen Fibroblasten (MEF) und humanen Epithelzellen konnte gezeigt werden, dass sie in der Lage sind, im Kulturmedium mit 300 µg/ml Emetine mehrere Stunden zu überleben, wobei bereits nach zwei Stunden ein Effekt der Protein Synthese Inhibierung auf die mRNA Expression festgestellt werden konnte [176, 187]. Voraussichtlich könnten die mit ES-Zellen beobachteten Schwierigkeiten durch die Verwendung einer robusteren Zelllinie, wie z.B. der A293 Linie, die bereits für die transienten Transfektionen verwendet worden ist, behoben werden. Eine Alternative zu Emetine wäre die Inkubation der ES-Zellklone mit Cycloheximide, das ebenfalls als Translationshemmer die Protein Biosynthese und damit den NMD Mechanismus blockiert, so dass PTCs enthaltende mRNAs nicht mehr degradiert werden können [188, 189]. Möglicherweise kann mit diesem Inhibitor eine bessere Überlebensrate von ES-Zellen erreicht werden, um anhand von RNA Analysen eine NMD vermittelte Degradierung und Inaktivierung des Luciferase Reporters nachweisen zu können.

### **3.3.8 NMD Kassetten als Bestandteil von *gene targeting* Kassetten**

Um Gene erfolgreich zu inaktivieren, ist es bislang erforderlich, ihre Struktur und vor Allem die Intronphasen des entsprechenden Gens zu kennen, weil es in den meisten Fällen nur zu einer vollständigen Inaktivierung durch Deletion eines Exons kommt, wenn das Leseraster der verbleibenden Exons zumindest teilweise verschoben wird. Die Wirkung

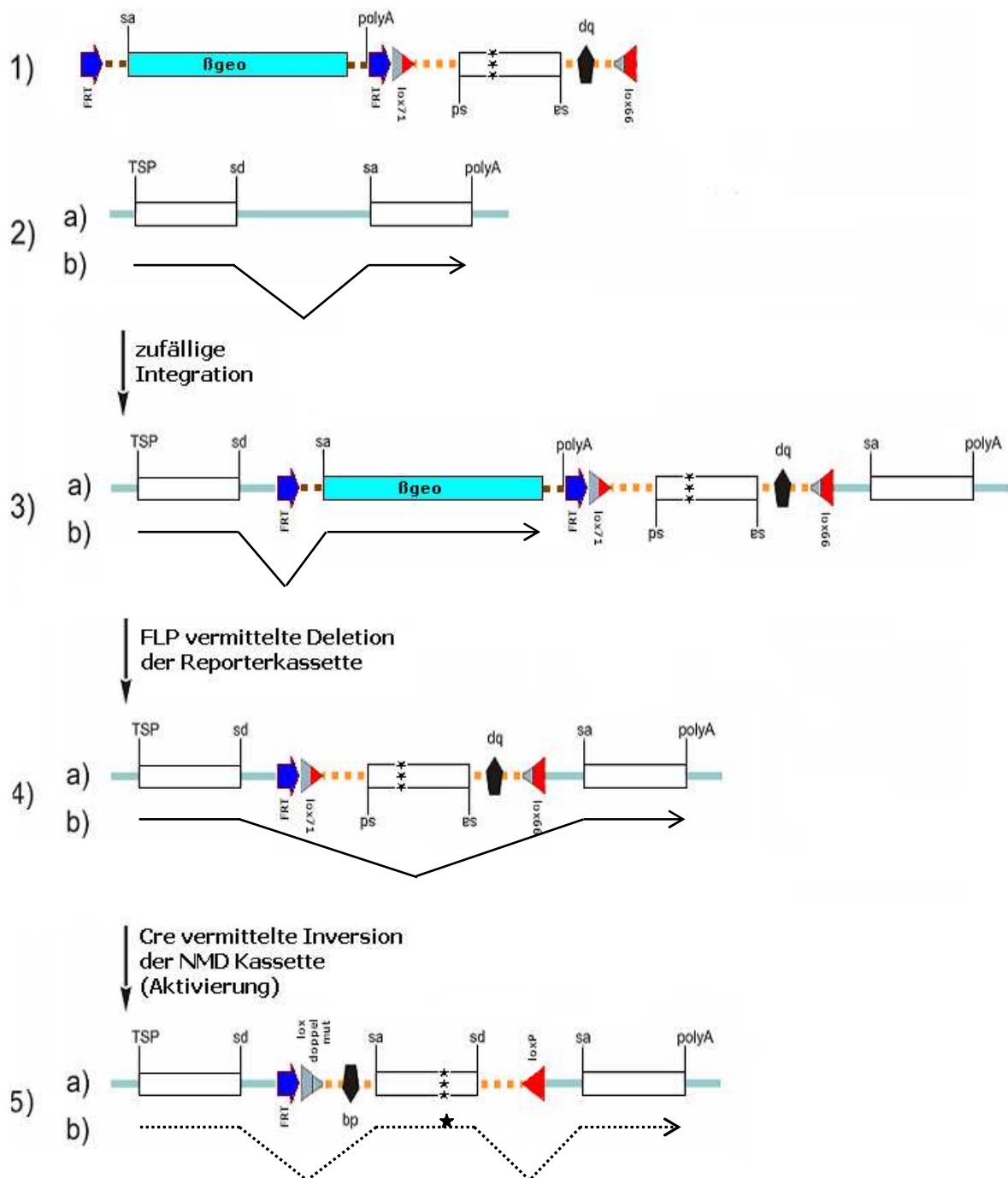
von NMD Kassetten ist unabhängig von der Intronphase, die ein beliebiges Intron aufweist, in das eine NMD Kasette inseriert werden soll, weil die NMD vermittelte Degradierung der RNA nur von einem ausreichenden Abstand des prämaternen Terminationscodons (PTC) von der nächsten stromabwärts gelegenen *splice donor site* und dadurch unabhängig von der Lokalisation des PTC in der mRNA ist. Dies erlaubt einen wesentlich größeren Spielraum bei der Planung von Konstrukten zur gezielten Mutagenese als herkömmliche Methoden. Weil die NMD Kasette mit einem deletierbaren Selektionsmarkergen verbunden werden kann, ist ein einzelner Klonierungsschritt für die Herstellung von *gene targeting* Konstrukten mit NMD Kassetten notwendig, die für eine komplette Inaktivierung, konditional inaktivierbare oder reaktivierbare Aktivität von Genen sowie für eine mehrfach konditional veränderbarer Genaktivität eingesetzt werden können. Außerdem sind entsprechende NMD Konstrukte auch zur gezielten Insertion mittels homologer Rekombination in ein Exon eines Zielgens geeignet. Ein solches Konstrukt muss ein von vollständigen Introns flankiertes Exon mit PTCs enthalten. Das Konstrukt muss so in ein Exon eines Zielgens inseriert werden, dass die Intronsequenz am 5' Ende bzw. am 3' Ende zusammen mit stromaufwärts bzw. stromabwärts gelegenen Sequenzen eines Exons, in das die NMD Kasette inseriert wurde, eine neue funktionale *splice donor* bzw. *splice acceptor site* ergibt. Auf diese Weise wird ein ursprüngliches Exon des Zielgens in zwei funktionale Exons geteilt und das von Introns flankierte NMD vermittelnde Exon der NMD Kasette als zusätzliches Exon eingeführt.

#### 3.3.9 NMD Kassetten als Bestandteil von *gene trapping* Kassetten

Die Einsatzmöglichkeiten einer induzierbaren NMD Kasette beschränken sich nicht nur darauf, dass sie als Bestandteil von *gene targeting* Konstrukten zur gezielten Mutagenese mittels homologer Rekombination eingesetzt werden kann und einen mehrfach konditionalen Aktivitätswechsel eines Zielgens ermöglicht (Abbildung 2.3.1). Die NMD Kasette kann auch als Bestandteil eines *gene trapping* Konstrukts zur ungerichteten Mutagenese verwendet werden, in dem zunächst eine Kombination aus dem *neo* Selektionsmarker- und *lacZ* Reportergen, nämlich  $\beta$ -geo, inaktivierend wirkt. Als *gene trappings* einsetzbare Konstrukte bieten den Vorteil, dass sie unabhängig von homologer Rekombination zufällig ins Genom integriert werden können und dadurch die Inaktivierung von vielen verschiedenen Genen ermöglichen [131]. Ein solches Konstrukt enthält neben der NMD Kasette ein unvollständiges  $\beta$ -geo Fusionsgen, das erst nach einer Insertion in ein Gen seine Funktionalität erlangt, so dass ein Transkript aus dem stromaufwärts der Insertionsstelle lokalisierten Exon und  $\beta$ -geo gebildet werden kann. Das entsprechende Fusionsprotein kann dann zur Selektion und Identifizierung von Transformanten



eingesetzt werden. Um eine Deletion des kombinierten Selektionsmarker- und Reportergens zu ermöglichen, wird es von FRT Erkennungssequenzen [23] flankiert.



**Abb. 3.3.1: Konditionales gene trapping mittels einer induzierbaren nonsense mediated mRNA decay vermittelnden Kasette**

1) induzierbare NMD Kasette mit Reporterkassette

2) genomischer Locus mit zwei Exons (a) und entsprechendes Primärtranskript (b)

3) genomischer Locus nach zufälliger Integration der NMD Kasette (a) und entsprechendes Primärtranskript (b)

4) genomischer Locus mit NMD Kasette nach FLP vermittelter Deletion der Reporterkassette (a) und entsprechendes Primärtranskript (b)

5) genomischer Locus nach Cre vermittelter Inversion und Aktivierung der NMD Kasette (a) und PTC markiertes Primärtranskript, das durch nonsense mediated mRNA decay degradiert wird (b)

TSP, Transkriptionsstartpunkt; Stern, als PTC dienendes Stopcodon; bp, branch point; polyA, Polyadenylierungssignal; sd, splice donor; sa, splice acceptor.

Die NMD Kasette wird in der vorgestellten Ausführungsvariante gezielt in ihrer inaktiven Orientierung mit  $\beta$ -geo verbunden, so dass nach FLP vermittelter Deletion des  $\beta$ -geo Fusionsgens das getroffene Gen zunächst aktiv vorliegt. Durch eine Cre vermittelte Inversion der Kasette an den flankierenden lox66/71 Sequenzen [42] wird die NMD Kasette in ihre NMD vermittelnde Orientierung gedreht und übernimmt die inaktivierende Funktion des Gens. Insgesamt entsprechen Gene, die mittels der in Abbildung 3.3.1 dargestellten *gene trapping* Strategie mutiert werden, nach der Deletion des  $\beta$ -geo Markergens, Genen, die eine invertierbare NMD Kasette durch homologe Rekombination integriert haben.

In der beschriebenen Ausführungsform des *gene trapping* Konstrukts erfolgt die Expression des kombinierten Markers, wenn das Konstrukt stromabwärts einer *splice donor site* eines Exons inseriert worden ist, was auch für konventionelle *gene trapping* Konstrukte gilt [129]. Dieses Konstrukt bietet aber den Vorteil, dass nicht vollständig durch das kombinierte Markergen inaktivierte Gene nach dessen Deletion durch die NMD Kasette vermittelte Degradierung des Transkripts komplett inaktiviert werden können. Solche hypomorphen Mutationen eines Gens werden erzeugt, wenn das Konstrukt im 3' Bereich des Gens inseriert und dadurch eine mRNA gebildet wird, die für ein fast vollständiges Protein kodiert [2]. Die mit Rekombinase Erkennungssequenzen flankierte NMD Kasette bietet je nach ursprünglicher Orientierung der NMD Kasette im *gene trapping* Konstrukt den Vorteil, dass ein ursprünglich durch ein Selektionsmarker- und Reportergen inaktiviertes Zielgen nach erfolgter Deletion des kombinierten Fusionsmarkers in ein konditional inaktivierbares oder konditional aktivierbares Allel umgewandelt werden kann.

Die Mehrzahl der bekannten für das *gene trapping* verwendeten Konstrukte ist nicht zur Herstellung von Mutanten geeignet, in denen ein Gen konditional inaktiviert werden kann. Eine *gene trapping* Kasette, die eine konditionale Inaktivierung eines getroffenen Gens durch seine Inversion in Transkriptionsrichtung ermöglicht, wurde von Xin und Kollegen hergestellt [190]. Das Konstrukt setzt sich aus einer Kasette zur Geninaktivierung und einer *gene trapping* Kasette zusammen. Die durch mutierte loxP Sequenzen flankierte inaktivierende Kasette enthält eine *splice acceptor site*, ein mit dem IRES Element fusioniertes GFP Reportergen und ein polyA Signal, so dass die Kasette unabhängig vom Leseraster aktiviert werden kann. Der FRT flankierte als *gene trapping* dienende Teil des Konstrukts enthält ein Puromycin Resistenzgen unter der Kontrolle eines ubiquitär aktiven Promotors ohne ein polyA Signal. Folglich ist das Resistenzgen nur aktiv, wenn das Konstrukt in einem Intron stromaufwärts eines polyA Signals vorliegt. Nach einer zufälligen Insertion des Konstrukts und FLP vermittelter Deletion des *gene trapping*

Abschnitts erfolgt die Inaktivierung des Gens mittels Cre vermittelter Inversion der Kassette. Falls die Insertion des Konstrukts stromaufwärts von einem 3'-terminalen Exons erfolgt, kann eine nahezu vollständige mRNA gebildet werden, die in den meisten Fällen für ein funktionales Protein kodiert. In solchen Fällen ist keine vollständige Inaktivierung des Zielgens durch das Konstrukt zu erwarten.

Die von Schnütgen und Kollegen entwickelte konditionale *gene trapping* Kassette enthält 5' von einem kombinierten Selektionsmarker- und Reportergen eine *splice acceptor site* und am 3' Ende ein polyA Signal (Abbildung 1.8). Die Inaktivierung eines Zielgens erfolgt dabei nach Insertion der Kassette in ein Intron des Gens, indem der als Exon fungierende  $\beta$ -geo Marker im Leserahmen an das stromaufwärts gelegene Exon gespleißt wird. Das Zielgen liegt also zunächst inaktiv vor. Da die Kassette entsprechend der "FLEX" *switch* Methode von mutierten Rekombinase Erkennungssequenzen flankiert wird, kann durch eine mehrfache Inversion der Kassette der Aktivitätszustand des Zielgens mehrmals geändert werden [137]. Nachteile in Verbindung mit der Kassette sind ihre Größe und die Tatsache, dass für jede der drei möglichen Intronphasen eines Zielgens ein entsprechendes Konstrukt erzeugt werden muss.

Ein Nachteil der vorgestellten NMD basierenden *gene trapping* Kassette ist, dass ebenfalls drei unabhängige Konstrukte erzeugt werden müssen, die das kombinierte Selektionsmarker- und Reportergen, das als 3'-terminales Exon dient, in jeweils einer der drei möglichen Intronphasen enthalten.

Eine entsprechende Kassette kann neben der Verwendung zur ungerichteten Mutagenese auch für das *targeted trapping* verwendet werden. Bei dieser Methode wird ein ursprünglich für *gene trapping* eingesetztes Konstrukt gezielt in klonierte genomische Fragmente eines Zielgens eingebracht und mittels homologer Rekombination in den entsprechenden Locus inseriert [191]. Auch bei dieser Methode muss die Intronphase des Introns, in das das Konstrukt eingeführt werden soll, berücksichtigt werden.

Eine NMD Kassette kann allerdings auch direkt als *gene trapping* Konstrukt wirken, wenn sie mit einer vollständigen Selektionsmarkerkassette gekoppelt wird [168]. Die unabhängige Expression der Resistenzgens bietet den Vorteil, dass durch Insertion der Kassette auch Gene getroffen und identifiziert werden können, die in den Zellen inaktiv vorliegen und mit der oben beschriebenen Variante nicht entdeckt werden können. Außerdem ist die Wirkung einer solchen NMD Kassette aufgrund ihrer drei Stopcodons in allen Leserastern unabhängig von der Intronphase, so dass alle Zellen mit Allelen, in die eine NMD Kassette inseriert wurde, genutzt werden können. Ein Nachteil bei der

Verwendung der NMD Kasette in einem *gene targeting* Konstrukt ist, dass auch für Zellen selektioniert wird, in die eine Insertion der NMD Kasette in intergenische Bereichen erfolgte. Weil das Säugergenom zu 20 % aus Introns besteht und die mit Erkennungssequenzen flankierte NMD Kasette mittels Rekombinase vermittelter Inversion in eine aktive Orientierung gedreht werden kann, kann jede fünfte identifizierte Zelle für die Herstellung von konditional inaktivierbaren bzw. reaktivierbaren Allelen verwendet werden [168].

Diese Ausführungsform einer *gene trapping* NMD Kasette bietet aufgrund von Stopcodons in allen drei Leserastern des in der Kasette beinhalteten NMD vermittelnden Exons gegenüber herkömmlichen Konstrukten den Vorteil, dass sie unabhängig von der Intronphase und unabhängig davon funktioniert, in welches Intron eines Gens sie inseriert wird. Deshalb reicht eine auf NMD basierende *gene trapping* Kasette für alle intronhaltigen Gene eines Organismus aus, während für herkömmliche *gene targeting* Experimente insgesamt drei Konstrukte, jeweils eins für jede Intronphase, hergestellt werden müssten.

#### 3.3.10 Ausblick

Nach stabiler Transfektion von ES-Zellen mit NMD Plasmiden, die das NMD vermittelnde Exon im kodierenden bzw. nicht kodierenden Strang enthalten, wodurch eine NMD vermittelte Inaktivierung des als Zielgen gewählten *firefly* Luciferase Reporters ausgelöst bzw. kein Einfluss auf den Reporter ausgeübt werden sollte, konnte in keinem der identifizierten Klone eine Luciferase Aktivität beobachtet werden, so dass der Versuch wiederholt werden muss. Die Klone wurden neben der luminometrischen Bestimmung der Luciferase Aktivität auch dazu eingesetzt, mit einem Inhibitor die Protein Biosynthese und damit den NMD Prozess zu hemmen. Durch RNA Analysen mittels Northern Blot sollte anschließend gezeigt werden, dass die Inaktivierung der Luciferase Aktivität auf der NMD induzierbaren Kasette beruht, wenn sich Transkripte nachweisen lassen, die aufgrund von PTCs eigentlich dem NMD Prozess zugeführt werden und somit ohne eine NMD Hemmung nicht nachweisbar sind. Weil in einem initialen Experiment während der Inkubation der ES-Zellklone mit Emetine zur Inhibition der Protein Biosynthese ein schnelles Absterben der Zellen beobachtet werden konnte, soll die neue stabile Transfektion der NMD Plasmide in Zellen der A293 Zelllinie erfolgen. Dazu sollen die Plasmide mit einer Restriktionsendonuclease linearisiert werden, deren spezifische DNA Basensequenz stromabwärts des gesamten NMD Konstrukts liegt, um sicherzustellen, dass der Promotor während der Verdau- und Insertionsreaktion nicht beschädigt wird. Die isolierten Klone sollen dann mittels Lumineszenzmessung auf ihre Luciferase Aktivität

untersucht und mit Emetine inkubiert werden, um mittels RNA Analysen nachweisen zu können, dass die Inaktivierung des Zielgens auf der NMD vermittelnden Wirkung der induzierbaren NMD Kasette beruht.

Zum Nachweis des Prinzips soll die mit Rekombinase Erkennungssequenzen flankierte induzierbare NMD Kasette in den *HPRT* Locus von ES-Zellen inseriert werden. Das *HPRT* Gen liegt auf dem X-Chromosom, so dass aus männlichen Embryonen stammende ES-Zellen hemizygot für *HPRT* sind. Somit muss nur eine Kopie des Gens inaktiviert werden, um einen Phänotyp zu erhalten. ES-Zellklone, in denen das *HPRT* Gen durch die NMD vermittelnde Wirkung einer in Transkriptionsrichtung inserierten NMD Kasette erfolgreich inaktiviert wurde, könnten durch eine Selektion mit Purinanalogen wie 6-Thioguanosin (6-TG) oder 8-Azaguanosin (8-AG) identifiziert werden, die bei Wildtyp Zellen zum Tod führen [11]. Zur Identifizierung von ES-Zellklonen, bei denen nach einer Rekombinase vermittelten Inversion der Kasette auf den nicht kodierenden Strang die *HPRT* Aktivität wiederhergestellt wurde, könnte eine Selektion mit Hypoxanthin-aminopterin-thymin (HAT) Medium erfolgen, in dem wiederum nur Zellen mit einem funktionellen *HPRT* Gen wachsen können.

## 4. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Herstellung und Optimierung von DNA Konstrukten zur Cre Rekombinase Expression sowie zur gezielten und ungerichteten konditionalen Inaktivierung von Genen in eukaryotischen Zellen bzw. in Mäusen.

Bifunktionale Cre Expressionskonstrukte können *in vivo* von der Expression einer Hormon abhängigen Cre-FRT-ERT2 Fusionsrekombinase durch FLP vermittelte Rekombination auf die Expression einer konstitutiv aktiven Cre-FRT-NLS Form umgeschaltet werden (regulierbar zu konstitutiv aktiv). Sie ermöglichen die Herstellung von Mäusen, die die Cre Rekombinase sowohl gewebespezifisch induzierbar als auch gewebespezifisch konstitutiv exprimieren. Ziel dieser Dissertation war die Generierung bifunktionaler Cre Expressionskonstrukte, die mehrere Liganden bindende Domänen (LBD) von Hormonrezeptoren enthalten. Hiermit sollte untersucht werden, ob das Signal-zu-Rausch Verhältnis (Liganden induzierte Rekombination zu Hintergrundrekombination) durch zusätzliche regulatorische Elemente verbessert werden kann. Insgesamt wurden vier unterschiedliche Konstrukte hergestellt und im Hinblick auf kontrollierte Cre Expression untersucht. Das Ergebnis ist, dass mit einer Vervielfältigung der mit Cre fusionierten LBDs keine Verbesserung des Signal-zu-Rausch Verhältnisses erzielt werden kann. Des Weiteren wurde ein bifunktionales Cre Expressionskonstrukt hergestellt, das in seiner ursprünglichen Form ein konstitutiv aktives Cre-FRT-NLS Fusionsprotein exprimiert und *in vivo* durch FLP vermittelte Rekombination auf die Expression einer Liganden induzierbaren Cre-FRT-ERT2 Fusionsrekombinase umgeschaltet werden kann (konstitutiv aktiv zu regulierbar). Dieses Konstrukt zeigt ein gutes Signal-zu-Rausch Verhältnis. Das neue bifunktionale Cre Expressionskonstrukt kann zur Herstellung von transgenen Mäusen eingesetzt werden, um eine konstitutiv aktive Rekombinase unter der Kontrolle eines gewebespezifischen Promotors zu exprimieren. Durch Verpaarung mit FLP Rekombinase exprimierenden Mäusen können Nachkommen erhalten werden, die dann eine Liganden induzierbare Fusionsrekombinase gewebespezifisch exprimieren.

Gewebespezifische Cre Expressionskonstrukte, die eine Co-Expression der Rekombinase und des endogenen Gens erlauben, in das sie inseriert wurden, lassen sich bisher als IRES Konstrukte herstellen. Diese Konstrukte haben jedoch den Nachteil, dass die Proteine nicht in einem äquimolekularen Verhältnis gebildet werden. In dieser Arbeit wurden bicistronische Vektoren generiert, die mittels der 2A "CHYSEL" Technologie eine koordinierte Co-Expression einer NLS-Cre Fusionsrekombinase und eines eGFP Markers in äquimolekularen Mengen ermöglichen sollen. Um eine Co-Expression der Gene von einem Plasmid zu erzielen, muss die 2A kodierende Sequenz in das gleiche Leseraster zwischen diese Gene kloniert werden. Anhand von Analysen der bicistronischen Vektoren wurde gezeigt, dass eine Co-Expression von Cre und eGFP mit Hilfe der 2A "CHYSEL"

Technologie möglich ist. Die Methode könnte zur Herstellung von Konstrukten für die Erzeugung von transgenen Cre Mäusen verwendet werden, wenn sowohl die Co-Expression des endogenen Gens als auch des Transgens in äquimolekularen Mengen sichergestellt werden soll.

In der vorliegenden Arbeit sollte eine neue Methode etabliert werden, die eine konditionale Inaktivierung von Genen bzw. Reaktivierung zuvor inaktivierter Gene erlaubt. Hierzu wurden induzierbare NMD Kassetten generiert, die Stopcodons in allen drei Leserastern enthalten und von mutierten Rekombinase Erkennungssequenzen in entgegengesetzter Orientierung flankiert werden. Wird eine induzierbare NMD Kassette in Transkriptionsrichtung in ein beliebiges Zielgen inseriert, so wird eines der drei Stopcodons als PTC erkannt, wodurch der NMD Prozess ausgelöst wird, der zur Degradierung der mRNA und damit zur Inaktivierung der Genaktivität führt. Mittels Rekombinase vermittelter Inversion kann die induzierbare NMD Kassette in den nicht kodierenden Strang platziert werden, wodurch die Genaktivität wiederhergestellt wird. Es wurden sechs unterschiedliche induzierbare NMD Kassetten hergestellt, von denen eine Kassette eine nahezu vollständige Geninaktivierung vermitteln konnte. Diese Kassette kann als Bestandteil von *gene targeting* Konstrukten zur gezielten Mutagenese von Genen mittels homologer Rekombination sowie als Bestandteil von *gene trapping* Konstrukten zur ungerichteten Mutagenese mittels zufälliger Insertion in Gene eingesetzt werden.

## 5. Material und Methoden

### 5.1 Chemikalien allgemein

Alle Chemikalien, Reagenzien und Lösungen, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, hatten den Reinheitsgrad *pro analysis* und wurden von Amersham Biosciences, BioRad, Boehringer Ingelheim, Fluka, Höchst, Invitrogen, Merck, Millipore, Promega, Riedel de Haen, Roche, Roth und Sigma-Aldrich bezogen. Zur Herstellung von Lösungen wurde hochreines Wasser verwendet (Milli-Q-System, Fa. Millipore).

### 5.2 Materialien für die Zellkultur

DMEM (GlutaMAX<sup>TM</sup>, Gibco), DMSO (ICN), Emetine (Sigma), Fötales Kälberserum (FCS) (Gibco bzw. PAA), FuGENE 6 (Roche), Gelatine (Sigma), G418 (Sigma), Hygromycin B (Sigma), LIF (*leukemia inhibitory factor*) (eigene Produktion), 2-Mercaptoethanol (50 mM) (Gibco), Na-Pyruvat (100 mM) (Gibco), nicht-essentielle Aminosäuren (100x) (Gibco), PBS (1x) (Gibco), Penicillin/Streptomycin-Lösung (10 U/μl Penicillin und 10 μg/μl Streptomycin in 0,85 % Saline) (Gibco), Trypsin-EDTA (1x) (Gibco). Zellkulturschalen, Zentrifugenröhrchen, Eppendorfgefäße und andere Plastikwaren wurden von Corning, Falcon und Nunc bezogen.

### 5.3 Zelllinien

#### Murine embryonale Stammzellen (ES-Zellen)

**IB10.1:** Diese Zelllinie zeichnet sich durch eine hohe Keimbahntransmissionseffizienz aus und stammt aus 129SV-Mäusen.

#### Affennierenzellen

**CV1-B5:** Reportergeren Zelllinie, in deren Genom mittels stabiler Transfektion ein Vektor integriert wurde, der den offenen Leserahmen (ORF) der *E. coli* β-Galactosidase, die mit einem Kernlokalisierungssignal (NLS) fusioniert ist, enthält. Das Gen wird nicht exprimiert, da es von der Promotorsequenz durch eine Neomycin Selektionskassette getrennt ist, die von zwei loxP Sequenzen flankiert wird. In Gegenwart aktiver Cre Rekombinase wird das *neo* Gen samt seinem poly(A) Signal deletiert, was in einer der β-Galactosidase Expression resultiert, die enzymatisch nachgewiesen werden kann. Die Menge des Reporterprodukts gilt als Maß für die Rekombinationseffizienz des zur Deletion verwendeten Rekombinationsproteins [110].



## Humane embryonale Nierenzellen

**293A:** Auch als HEK Zelllinie (*human embryonic kidney*) bekannt, die aus dem Nierenzellgewebe von Embryonen gewonnen wurde und vergleichsweise einfach zu handhaben ist.

## 5.4 Verwendete Medien, Lösungen und Puffer in der Zellkultur

### Medien

**Medium für ES-Zellen:** 500 ml DMEM (GlutaMAX™, 4500 mg/l Glucose, Pyridoxin, ohne Na-Pyruvat), 75 ml FCS, 6 ml Na-Pyruvat, 6 ml Streptomycin/Penicillin, 6 ml nicht essentielle Aminosäuren, 600 µl LIF. Zur Selektion wurde dem Medium 150 µg/ml Hygromycin B hinzugefügt bzw. 150 µg/ml Hygromycin B und 0,35 µg/ml G418.

**Medium für Nierenzellen:** 500 ml DMEM (GlutaMAX™, 4500 mg/l Glucose, Pyridoxin, ohne Na-Pyruvat), 60 ml FCS, 6 ml Na-Pyruvat, 6 ml Streptomycin/Penicillin.

**Einfriermedium (2x):** Medium für ES-Zellen mit 20 % DMSO und 50 % FCS.

### Lösungen

**Emetine Stocklösung:** 100 mg Emetine wurden in 1 ml sterilem H<sub>2</sub>O gelöst, so dass die Lösung eine Endkonzentration von 100 mg/ml hatte.

**Gelatine Lösung zum Beschichten der Kulturgefäße:** 0,1 % (w/v) Gelatine wird in PBS gelöst und sterilisiert.

**G418 Stocklösung:** 100 mg G418 wurden in 1 ml H<sub>2</sub>O gelöst und anschließend sterilfiltriert.

**4-Hydroxytamoxifen (4-OHT) Stocklösung:** 5 mg 4-OHT wurden in 500 µl Ethanol gelöst, so dass die Lösung eine Endkonzentration von 10 mg/ml hatte.

**Hygromycin B Stocklösung:** 50 mg Hygromycin B wurden in 1 ml H<sub>2</sub>O gelöst und anschließend sterilfiltriert.

**Mifepristone (RU486) Stocklösung:** 50 mg RU486 wurden in 1 ml Ethanol gelöst, so dass die Lösung eine Endkonzentration von 50 mg/ml hatte.

**Proteinase K Stocklösung:** 10 mg Proteinase K wurden in 1 ml 10 mM Tris/HCl (pH 7,4) gelöst.

### Puffer

**Lysis-Puffer (Tail-Puffer nach Laird):** Der Puffer besteht aus 200 mM NaCl, 100 mM Tris/HCl (pH 8,5), 5 mM EDTA (pH 8,0) und 0,2%igem (w/v) SDS. 100 µg/ml Proteinase K wurden jeweils kurz vor Gebrauch frisch dazugegeben.

**TE-Puffer, pH 7,4:** Der Puffer besteht aus 10 mM Tris/HCl (pH 7,4) und 1 mM EDTA (pH 8,0).

## **5.5 Methoden in der Zellkultur**

### **5.5.1 Einfrieren und Auftauen von Zellen**

Für das Einfrieren von Zellen wurde Einfriermedium mit DMSO verwendet, weil DMSO aufgrund seiner hygroskopischen Eigenschaften die Bildung von Eiskristallen verhindert. Die Zellen wurden abtrypsinisiert, mit Medium aufgefüllt und für 5 min bei 200 x g pelletiert. Anschließend wurden die Zellen im entsprechenden Medium Volumen resuspendiert, 1:1 mit Einfriermedium versetzt und in Kryoröhrchen bei -80 °C gelagert.

In Kryoröhrchen eingefrorene Zellen wurden zügig im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut, die Zellsuspension wurde in Röhrchen mit frischem Medium überführt und für 5 min bei 200 x g zentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurden dann im entsprechenden Medium Volumen resuspendiert und auf Kulturschalen ausgesät.

### **5.5.2 Splitten und Expandieren von Zellen**

Sobald die Zellen im subkonfluenten Stadium vorlagen, wurden sie passagiert, um eine mögliche Differenzierung (bei ES-Zellen) zu vermeiden. Dafür wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen, abtrypsinisiert, mit Medium aufgefüllt und in der gewünschten Verdünnung auf neue beschichtete Kulturschalen ausgesät. Ein Mediumwechsel erfolgte täglich.

### **5.5.3 Zellzahlbestimmung**

Die Zellzahlbestimmung erfolgte mittels Neubauer Zählkammer. Dabei wurde die Zellzahl pro ml ermittelt, indem die durchschnittliche Zellzahl pro Großquadrat bestimmt und mit  $10^4$  multipliziert wurde. Verdünnungen der Zellsuspension wurden in der Zellzahlbestimmung berücksichtigt.

### **5.5.4 Transiente Transfektion von Nierenzellen**

Die Zellen der CV1-B5 bzw. 293A Zelllinie wurden mittels FuGENE 6 Transfektionsreagenz transfiziert. Dabei bilden sich DNA Lipidkomplexe aus, die in den Zellkern aufgenommen werden können. Für die transiente Transfektion wurden 6-Loch bzw. 96-Loch Platten verwendet. Die Transfektion auf 6-Loch Platten erfolgte zur späteren lacZ Färbung (siehe 5.6) von CV1-B5 Zellen und die auf 96-Loch Platten für Reporteragen Analysen (siehe 5.7) von transfizierten CV1-B5 und 293A Zellen.

In eine 6-Loch Platte wurden jeweils  $6 \times 10^4$  CV1-B5 Reporterzellen pro Loch ausgesät und in 2 ml Medium für Nierenzellen inkubiert. Am folgenden Tag wurde einige Stunden vor Zugabe der Präzipitate das Medium durch frisches Medium ausgetauscht. Das Gesamtvolumen für die Präzipitate betrug jeweils 100  $\mu$ l. In sterile 2 ml Eppendorfgefäße wurden jeweils 93  $\mu$ l reines DMEM vorgelegt, 3  $\mu$ l gut gemischtes FuGENE 6 Reagenz dazugegeben und die Ansätze vorsichtig gemischt. Danach erfolgte die Zugabe von 3  $\mu$ l der entsprechenden Cre Plasmid DNAs (= 1  $\mu$ g) und 1  $\mu$ l des pGL3-Promoter Plasmids (= 0,3  $\mu$ g) zur Co-Transfektion. Die Ansätze wurden erneut gemischt und zur Bildung der DNA Lipidkomplexen für mindestens 15 min bei RT inkubiert. Zuletzt wurde das Gemisch tropfenweise auf die Zellen pipettiert und dabei möglichst gleichmäßig verteilt. Die Zellen wurden anschließend weiter kultiviert.

Für die Transfektion auf schwarzen Mikroluminometer geeigneten 96-Loch Platten wurden pro Loch  $5 \times 10^3$  CV1-B5 bzw. 293A Zellen ausgesät und in 100  $\mu$ l Medium für Nierenzellen inkubiert. Das Gesamtvolumen der Präzipitate betrug 20  $\mu$ l, wobei 1  $\mu$ l FuGENE 6 Reagenz, 3  $\mu$ l der entsprechenden Cre bzw. NMD Plasmid DNAs (= 0,3  $\mu$ g) und 1  $\mu$ l des pGL3-Promoter bzw. pMDIS Plasmids (= 0,1  $\mu$ g) zur Co-Transfektion mit 15  $\mu$ l DMEM gemischt und auf die Zellen verteilt wurden. Die Zellen wurden anschließend weiter kultiviert.

#### 5.5.5 Stabile Transfektion von ES-Zellen

ES-Zellen wurden für die Herstellung einer *Renilla* Luciferase Reporter Zelllinie mit dem pGL4.76[hRluc/Hygro] Plasmid transfiziert. Ein identifizierter Klon, bei dem eine *Renilla* Expression nachgewiesen werden konnte, wurde anschließend expandiert und zur stabilen Transfektion mit NMD Plasmiden eingesetzt. Ein Teil der *Renilla* Luciferase exprimierenden Zellen wurde bei  $-80^\circ\text{C}$  in Kryoröhrchen eingefroren (siehe 5.5.1).

Am Tag der Transfektion mussten so viele Zellen im subkonfluenten Stadium vorliegen, dass ca.  $10^6$  Zellen für die Transfektion eingesetzt werden konnten. Von einer entsprechenden Anzahl an Kulturschalen mit ES-Zellen wurden die Zellen nach dem Waschen mit 1x PBS mit Trypsin-EDTA gelöst. Die Zellen wurden dann in einem Zentrifugenröhrchen vereinigt, bei 200 x g für 5 min pelletiert und das Zellpellet in 10 ml PBS resuspendiert. Die Zellzahl wurde mittels Neubauer Zählkammer ermittelt. Von der Zellsuspension wurden  $10^6$  Zellen abgenommen, wiederholt bei 200 x g für 5 min zentrifugiert und in 800  $\mu$ l PBS aufgenommen. Die Zellsuspension wurde mit der sterilen zuvor linearisierten DNA (~5  $\mu$ g pGL4.76[hRluc/Hygro] DNA bzw. ~10  $\mu$ g NMD DNA) gemischt und in eine Elektroporationsküvette überführt. Die Elektroporation erfolgte bei 240 V und 475  $\mu$ F im Genpulsar von BioRad. Nach einer fünfzehnminütigen Inkubation bei RT wurden die Zellen auf Gelatine beschichtete Kulturschalen ausgesät und bei  $37^\circ\text{C}$

im Brutschrank inkubiert. Der Mediumwechsel erfolgte täglich. 48 h nach der Transfektion erfolgte die Selektion mit Hygromycin B bzw. mit Hygromycin B und G418. Nach 8-10 Tagen konnten ES-Zellklone gepickt werden.

#### **5.5.6 Isolierung von ES-Zellklonen**

Durch Selektion mit Hygromycin B bzw. G418 überleben nur die Zellklone, die das *Renilla* bzw. NMD Konstrukt in ihr Genom integriert haben. Aus der jeweiligen Transfektion konnten 39 Hygromycin B resistente bzw. 81 Hygromycin B und G418 resistente Zellklone gepickt werden. Für das Picken der Klone mussten die Zellkolonien groß genug sein, klar erkennbare Grenzen aufweisen und durften nicht differenziert sein. Vor dem Picken wurde eine 96-Loch Platte (mit runden Böden) mit 50 µl Trypsin-EDTA pro Loch vorbereitet. Die ES-Zellklone wurden in einem Volumen von 20 µl PBS gepickt und jeweils in ein Loch mit Trypsin-EDTA überführt. Etwa nach 10 min wurde die Trypsinreaktion durch Zugabe von 80 µl Medium für ES-Zellen abgestoppt. Dann wurde jeder gepickte Klon auf eine neue Gelatine beschichtete 96-Loch Platte (mit glatten Böden) aufgeteilt. Die Zellklone wurden im Brutschrank inkubiert und erhielten jeden Tag frisches Medium. Nachdem sie im subkonfluenten Stadium vorlagen, wurden sie auf jeweils fünf 96-Loch Platten gesplittet. Eine der jeweils fünf identischen Platten wurde für eventuelle spätere Expansion von Klonen bei -80 °C eingefroren (siehe 5.5.7). Die Klone der anderen 96-Loch Platten wurden zur DNA Aufarbeitung (siehe 5.5.8), zur Hemmung der Protein Biosynthese mittels Emetine (siehe 5.5.9) und für Reporteragen Analysen (siehe 5.7) weiter kultiviert.

#### **5.5.7 Einfrieren von 96-Loch Platten mit ES-Zellklonen**

Nachdem die Zellklone in der 96-Loch Platte dicht gewachsen waren, wurden sie direkt in dieser eingefroren. Dazu wurden die Zellklone mit 50 µl Trypsin vom Plattenboden abgelöst. Nach etwa 3 min wurde die Trypsinreaktion durch Zugabe von 50 µl Medium für ES-Zellen abgestoppt, die Zellklone wurden im Medium gut resuspendiert und mit 100 µl Einfriermedium versetzt. Zuletzt wurden die Platten mit Parafilm abgedichtet und zur Lagerung bei -80 °C eingefroren.

#### **5.5.8 Zelllyse und anschließende DNA Aufarbeitung aus ES-Zellklonen**

ES-Zellklone, die für die DNA Aufarbeitung vorgesehen waren, wurden auf Gelatine beschichtete 24-Loch Platten passagiert und weiter kultiviert, bis sie dicht gewachsen waren. Für die Zelllyse wurde jedes Loch mit Zellen zweimal mit je 400 µl PBS gewaschen. Danach erhielt jedes Loch 200 µl Lysis-Puffer (siehe 5.4.3), Gemisch aus 180 µl Tail-Puffer nach Laird [192] und 20 µl Proteinase K (10 mg/ml, Sigma). Die Platten wurden mit Parafilm verschlossen, 4-12 h bei 54 °C schüttelnd inkubiert und danach für

1 h auf Raumtemperatur (RT) abgekühlt. Zur Fällung der DNA erfolgte die Zugabe von 400 µl 96 % EtOH und die Platten wurden für mindestens 1 h bei RT schüttelnd inkubiert, bis die präzipitierte DNA am Plastikboden sichtbar war. Dann wurde die DNA für 30 min bei 3220 x g pelletiert, mit 70 % EtOH (400 µl/Loch) bei 3220 x g für 15 min gewaschen, getrocknet und schließlich in 100 µl TE-Puffer (siehe 5.4.3) ü.N. bei 54 °C gelöst. Die so gewonnene genomische DNA wurde für die Southern Blot Analyse mit dem entsprechenden Enzym gespalten. Die DNA wurde in einem 50 µl Verdauansatz mit 50 U Enzym, 5 µl 5-fach konzentriertem Puffer sowie 0,5 µl RNase I (10 mg/ml, DNase- und Protease-frei, MBI-Fermentas) über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am folgenden Tag erfolgte zum Verdauansatz die Zugabe von 10 µl Auftragspuffer und die DNA wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt.

### **5.5.9 Hemmung der Protein Biosynthese mittels Emetine**

ES-Zellklone, die zur Hemmung der Protein Biosynthese und damit auch des NMD Prozesses vorgesehen waren, wurden auf Gelatine beschichtete 24-well Platten passagiert. Nachdem sie im subkonfluenten Stadium vorlagen, wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden sie im Kulturmedium, das mit 100 µg/ml Emetine (ein wirksamer Inhibitor der Protein Synthese in Eukaryoten) versetzt wurde, weiter kultiviert.

### **5.6 lacZ Färbung**

Das farblose X-Gal wird unter Einwirkung der  $\beta$ -Galactosidase in das entsprechende Indoxylderivat überführt, das an der Luft zum blauen 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlorindigo oxidiert. Der blaue Indigofarbstoff ist in Wasser unlöslich und präzipitiert somit in der Zelle an der Stelle, wo das Enzym lokalisiert ist. Mittels eines Mikroskops kann es dort nachgewiesen werden. Vor der Färbung wurden die transient transfizierten Zellen der CV1-B5 Zelllinie (siehe 5.5.4) dreimal kurz mit PBS gewaschen, unter dem Abzug mit 2 ml 3 % PFA bedeckt und für 10 min fixiert. Anschließend erfolgte unter Schwenken ein fünfminütiger Waschschrift mit PBS, der dreimal wiederholt wurde. Als nächstes fand eine zehnminütige Inkubation der Zellen in PBS/0,2 % Triton auf der Wippe statt, gefolgt von einem viermaligen Waschschrift für je 5 min. Zuletzt wurde auf die Platte pro Loch 1 ml Reaktionsmix gegeben, die Platten wurden mit Frischhaltefolie umwickelt und über Nacht bei 37°C inkubiert bis eine Blaufärbung eintrat.

### 5.6.1 Lösungen

**3 % PFA Lösung:** Unter dem Abzug wurden 3 g PFA in 80 ml H<sub>2</sub>O unter Rühren auf 60°C erhitzt. Danach wurde 4 N NaOH dazugegeben, bis sich die Lösung klärte sowie 10 ml 10x PBS. Anschließend wurde mit H<sub>2</sub>O auf 100 ml aufgefüllt, die Lösung durch einen Papierfilter filtriert und der pH-Wert auf 7-7,5 eingestellt.

**Reaktionsmix:** Der Reaktionsmix wurde frisch aus X-Gal Mix und 2,5-5 % X-Gal Lösung angesetzt.

**0,2 % Triton:** 0,2 % (w/v) Triton wird in PBS gelöst.

**X-Gal Mix:** Der Mix wurde frisch in PBS angesetzt und enthält 5 mM KFe(CN)<sub>6</sub>II und KFe(CN)<sub>6</sub>III sowie 2 mM MgCl<sub>2</sub>

**X-Gal Lösung:** Für die Lösung wurden 2 mg/ml X-Gal in DMSO gelöst.

## 5.7 Reporter Assays zur Bestimmung von Reportergergen Aktivitäten

### 5.7.1 Dual-Light® System

Die Aktivität von allen Cre Expressionskonstrukten wurde anhand der  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität nach der transienten Transfektion (siehe 5.5.4) der entsprechenden Cre Plasmide in die Zellen der CV1-B5 Reporterzelllinie direkt auf 96-Loch Platten luminometrisch (in einem Mikroluminometer) mittels Dual-Light® System ermittelt. Das System ermöglicht den gleichzeitigen Nachweis der *firefly* Luciferase, die zum Abgleich verwendet wurde und der  $\beta$ -Galaktosidase. Die Versuchsdurchführung erfolgte nach dem vom Hersteller (Applied Biosystems) angegebenen Protokoll für 96-Loch Platten.

### 5.7.2 Dual-Luciferase® Reporter Assay System

Die Wirkung der NMD Konstrukte wurde anhand der *firefly* Luciferase Aktivität nach der transienten Transfektion (siehe 5.5.4) der entsprechenden NMD Plasmide in die Zellen der 293A Zelllinie bzw. nach der stabilen Transfektion (siehe 5.5.5) der entsprechenden NMD Plasmide in ES-Zellen direkt auf 96-Loch Platten luminometrisch (in einem Mikroluminometer) mittels Dual-Luciferase® Reporter Assay System ermittelt. Die ES-Zellklone wurden dafür auf eine schwarze 96-Loch Platte passagiert. Das System ermöglicht den gleichzeitigen Nachweis der *Renilla* Luciferase, die zum Abgleich verwendet wurde und der *firefly* Luciferase. Die Versuchsdurchführung erfolgte nach dem vom Hersteller (Promega) angegebenen Protokoll für 96-Loch Platten.

Der Nachweis der *Renilla* Luciferase Aktivität nach der stabilen Transfektion (siehe 5.5.5) von ES-Zellen mit einem *Renilla* Plasmid zur Herstellung einer Reporter Zelllinie erfolgte ebenfalls mittels Dual-Luciferase® Reporter Assay System. Dazu wurden die Zellklone

auf 24-Loch Platten passagiert und die Versuchsdurchführung erfolgte nach dem vom Hersteller (Promega) angegebenen Protokoll für ein manuelles Luminometer.

## 5.8 Molekularbiologische Standardmethoden

Die meisten der nachfolgend aufgeführten Methoden wurden, wie in "*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*" beschrieben [193], durchgeführt.

### 5.8.1 Verwendete Puffer

**Church-Puffer:** 40 ml 1 M NaHPO<sub>4</sub> (pH 6,8) und 50 ml 20 % (v/v) SDS wurden mit bidest. H<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 1 Liter gebracht.

**STE-Puffer (1x):** Für den STE-Puffer wurden 0,1 M NaCl, 10 mM Tris/HCl (pH 8,0) und 1 mM EDTA (pH 8,0) in bidest. H<sub>2</sub>O gelöst.

**TAE (50x):** 242 g Tris-Base, 57 ml 100 % (v/v) Essigsäure und 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) wurden auf einen Liter mit bidest. H<sub>2</sub>O aufgefüllt und gelöst.

### 5.8.2 Isolierung von DNA

Die Isolierung von Plasmid DNA und BAC erfolgte nach Angaben des Herstellers mit den Isolierungssystemen Nucleo Spin Plasmid und Nucleobond AX 500 (Machery-Nagel).

### 5.8.3 Restriktionsverdaus

Zur Spaltung von Plasmiden und genomischer DNA aus ES-Zellen sowie zur Linearisierung von Plasmiden vor einer stabilen Transfektion wurden Restriktionsendonukleasen und enzymespezifische Puffer nach Angaben des Herstellers (MBI Fermentas bzw. New England Biolabs) eingesetzt.

### 5.8.4 Agarosegelelektrophorese

Agarose ist ein Polysaccharid, das in 1 %igen (w/v) TAE- oder TBA-Lösungen nach Aufkochen und Gelieren ein charakteristisches Netz mit Poren von etwa 150 nm Größe ausbildet. Aufgrund der negativen Gesamtladung der DNA wandert diese in einem elektrischen Feld von der Kathode zur Anode und wird dabei entsprechend der Größe der einzelnen DNA Fragmente aufgetrennt. Für die Auftrennung größerer DNA Fragmente (z.B. die Auftrennung chromosomaler DNA für Southern Blot) wurden 0,8 – 1 %ige Agarosegele angefertigt. Für kleinere Fragmente wurden entsprechend höherprozentige Gele angefertigt. Bevor das Gel geliert war, wurden 1/3000 bis 1/4000 Volumen 1 %iges 3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenylphenanthridiniumbromid (Ethidiumbromid) zugesetzt, um die DNA nach Auftrennung unter UV-Licht sichtbar zu machen. Auf alle Agarosegele wurde zusätzlich ein Längenstandard (1 kb Leiter von Peqlab) mit genau definierten

Fragmentgrößen aufgetragen. Außerdem wurde die DNA vor dem Auftragen in die Geltaschen mit 1/6 Volumen Ladepuffer versetzt.

#### 5.8.5 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

In der vorliegenden Arbeit wurde die PCR zur Erzeugung von PCR Fragmenten für die klassische Klonierung, zur Erzeugung von PCR Fragmenten für homologe Rekombination mittels ET Klonierung und zum Nachweis von homolog rekombinierten Klonen eingesetzt. Die Primer für die jeweilige PCR wurden ausgehend von Sequenzdaten entworfen und von BioSprings bezogen. Als Polymerase wurde Taq-Polymerase (Roche), selbst hergestellt (*home*) Taq-Polymerase, GoTaq® DNA Polymerase (Promega) und AmpliTaq® DNA Polymerase (Applied Biosystems) verwendet. PCR Reaktionen wurden in einem Gesamtvolumen von 25 µl mit entsprechenden Mengen an DNA Matrize, PCR Puffer, 10 mM dNTPs, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, *sense* bzw. *antisense* Primer (10 pmol/µl), Taq-Polymerase (x U/µl) und MilliQ H<sub>2</sub>O angesetzt.

Die einzelnen PCR Programme wurden individuell ausgehend von der Schmelztemperatur der Primer, von der erwarteten Größe des PCR Produkts sowie Art der eingesetzten DNA Matrize gewählt. Die Sequenzen aller verwendeten Primer sind im Anhang aufgeführt.

#### 5.8.6 Herstellung eines Polylinkers

Die Sequenzen für einen neuen Polylinkers für den pGL2luc-lambdaIn2 Luciferase Expressionsvektor wurden mittels VNTi Programm ermittelt. Um einen Polylinker herzustellen wurden jeweils zwei komplementäre Oligonukleotide im äquimolekularen Verhältnis gemischt und 4 min bei 90°C erhitzt, um zufällige Doppelstränge zu denaturieren. Anschließend erfolgte eine zehnminütige Inkubation bei 70°C und eine schrittweise Abkühlung auf RT, wodurch das *annealing* der jeweils zusammengehörigen Oligonukleotide stattfand. Die doppelsträngigen DNA Moleküle wurden dann in den Vektor kloniert.

#### 5.8.7 Aufreinigung von DNA aus einem Agarosegel

Die Aufreinigung von DNA Fragmenten aus Restriktionsverdaus (siehe 5.8.2) oder von PCR Produkten erfolgte mit dem *Nucleo Spin Extract Kit* von Macherey-Nagel bzw. dem *QIAquick Gel Extraction Kit* von Qiagen. Die aufzureinigende DNA wurde mit einem Skalpell aus dem Agarosegel isoliert und nach dem vom Hersteller angegebenen Protokoll aufgereinigt.



### 5.8.8 Klassische Klonierung von DNA Fragmenten, PCR Produkten sowie ET Klonierung

Unter dem Begriff Klonierung versteht man das künstliche Zusammenfügen von DNA Molekülen. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei verschiedene Methoden eingesetzt. Bei der klassischen Methode wird die DNA mit einem Restriktionsenzym gespalten und ein DNA Fragment mit passenden kohäsiven oder geraden Enden, das entweder durch einen Restriktionsverdau oder eine PCR erzeugt wurde, mittels einer T4 DNA-Ligase (New England Biolabs) eingefügt [193].

Die Subklonierung von PCR Produkten, die mittels Taq-Polymerase erzeugt wurden, erfolgte durch TA Klonierung mit den Systemen pGEM®-T Easy (Promega) oder pCR4-TOPO® (Invitrogen).

Die Methode des ET Klonierens beruht auf homologer Rekombination zwischen DNA Molekülen mit gleicher Sequenz und wird durch die Enzyme RecE und RecT vermittelt, die ursprünglich aus Phagen stammen und mittels des Expressionsvektors pSC101-BAD-gba (Genebridges) in fast alle *E. coli* Stämme eingeschleust werden können. In der vorliegenden Arbeit wurde das ET Klonieren verwendet, um ein PCR Produkt homolog in einen BAC einzubringen.

Bakterienzellen, die den BAC mit der genomischen Sequenz des *Epx* Gens enthalten, wurden durch Elektroporation des Vektors pSC101-BAD-gba ET-kompetent. Zur Selektion für die Aufnahme des Vektors wurden sie auf eine Agarplatten mit Tetracyclin ausgestrichen, von der am folgenden Tag Kolonien gepickt und in 1 ml Medium (LB-Medium + 3 µg/ml Tetracyclin + 15 µg/ml Chloramphenicol) ü.N. bei 30°C im Schüttelinkubator inkubiert wurden. Der ET-Klonierungsvektor besitzt einen temperatursensitiven Replikationsstartpunkt und wird bei Temperaturen über 30°C nicht repliziert. Am nächsten Tag wurden 30 µl der Kultur in 1,4 ml frisches Medium überführt und bis zu einer OD600 von 0,1 bei 30°C schüttelnd inkubiert. Dann wurde der Kultur zur Induktion der Expression der Rekombinationsenzyme L-Arabinose in einer Konzentration von 0,1 - 0,2 % zugesetzt und die Bakterien wurden bei einer Temperatur von 37°C bis zum Erreichen einer OD600 von 0,4 weiter inkubiert. Anschließend wurde das PCR Produkt (bifunktionales Cre Expressionskonstrukt mit *neo* Selektionskassette) in die Bakterienzellen elektroporiert, so dass eine Rekombination zwischen BAC und PCR Produkt erfolgen konnte. Vor der Elektroporation wurden die Bakterienzellen für 30 sec in einer gekühlten Tischzentrifuge bei 110000 x g pelletiert und dreimal in kaltem H<sub>2</sub>O gewaschen. Zuletzt wurden die Zellen in 50 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen und mit dem PCR-Produkt in einer Elektroporationsküvette vermischt. Die Elektroporation erfolgte am BioRad Genpulsar II bei 1350 V, 600 mA und 25 µF. Nach der Elektroporation wurden die Bakterien sofort mit warmem LB-Medium ohne Antibiotika versetzt und bei 37°C für

70 min inkubiert. Durch die erhöhte Temperatur wurde gleichzeitig die Replikation des ET-Plasmids unterbunden, so dass unerwünschte Rekombinationsreaktionen ausgeschlossen werden. Anschließend wurden die Bakterien auf LB-Agarplatten mit 15 µg/ml Kanamycin ausplattiert und bei 37°C ü.N. inkubiert, wobei nur Kolonien heranwachsen sollten, in denen das PCR Produkt mit *neo* Selektionskassette in den BAC integriert wurde.

#### 5.8.9 Isolierung von DNA Sonden

Die Sonde zur Bestimmung der Kopienzahl der NMD Konstrukte nach der stabilen Transfektion (siehe 5.5.5) von ES-Zellen mit NMD Plasmiden wurde mittels Restriktionsspaltung aus dem pGL2luc-lambdaIn2 Plasmid isoliert und aufgereinigt (1,1 kb). Die eingesetzte Sonde hybridisiert mit der Sequenz des *firefly* Luciferase Exons 2.

#### 5.8.10 Southern Blot und Hybridisierung

Der Southern Blot diente in der vorliegenden Arbeit zur Detektion von NMD Konstrukten in ES-Zellklonen. Zur weiteren Untersuchung der gelelektrophoretisch aufgetrennten DNA wurde diese auf eine feste Membran transferiert. Das Blotten erfolgte mittels eines alkalischen Kapillarblots. Geblottet wurde auf eine Nylonmembran (Hybond-N<sup>+</sup>, Amersham Pharmacia Biotech). Nach dem Blotten wurde die Membran zur Fixierung der DNA 1 h bei 80 °C gebacken. Die fixierte DNA konnte dann durch Hybridisierung identifiziert werden. Vor der Hybridisierung wurde die getrocknete Membran ca. 1 h bei 65 °C in Church-Puffer schwenkend im Wasserbad gewaschen. Anschließend wurde die Membran für mind. 1 h in ca. 10 ml QuickHyb<sup>®</sup>-Hybridisierungslösung (Stratagene) bei 65°C in einer Hybridisierungsröhre prähybridisiert. Die Hybridisierung erfolgte ü.N. bei 65°C. Dazu wurde die denaturierte DNA Sonde mit 1 ml der Prähybridisierungslösung gemischt und zu der bereits vorhandenen Hybridisierungslösung hinzugefügt. Am folgenden Tag wurde die Membran in Church-Puffer 2-3 mal bei 65 °C schwenkend im Wasserbad gewaschen. Zuletzt wurde die Membran feucht in Folie eingeschweißt, mit einem Röntgenfilm in eine Filmkassette gelegt und mindestens 24 h bei –70°C exponiert. Die markierten Hybride konnten durch Autoradiographie identifiziert werden.

#### 5.8.11 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden

Die Markierung von DNA Sonden erfolgte mittels *Ladderman<sup>™</sup> Labeling Kit* (Takara) und dem Isotop  $\alpha^{32}\text{P}$ [dCTP]. Für die Markierung wurden ca. 50-100 ng DNA eingesetzt. Die Aufreinigung der markierten Sonde wurde mit Hilfe von *ProbeQuant<sup>™</sup> G-50 Micro* Säulen (Amersham Pharmacia Biotech) durchgeführt.

## 5.9 Bakterien

### 5.9.1 Medien für Bakterien

**LB-Vollmedium für *E.coli*:** Zu 950 ml bidest. H<sub>2</sub>O wurden 10 g Bacto-Trypton, 5 g Bacto-Hefeextrakt und 5 g NaCl gegeben. Nach Rühren wurde der pH-Wert auf 7,0 eingestellt. Das Volumen wurde dann auf 1 l mit bidest. H<sub>2</sub>O aufgefüllt. Anschließend wurde das Medium autoklaviert.

**LB-Agarplatten für *E.coli*:** 15 g Agar wurden vor dem Autoklavieren zu 1 l LB-Medium hinzugegeben.

### 5.9.2 *Escherichia coli* Zelllinien

**DH5 $\alpha$ <sup>TM</sup>:** chemokompetente *E.coli*; Genotyp: F<sup>-</sup>,  $\Phi$ lacZ  $\alpha$  M15, endA1, recA1, hsdR17 (r<sub>k</sub><sup>-</sup>, m<sub>k</sub><sup>-</sup>), supE44, thi-1, gyrA96, relA1,  $\Delta$  (lacZYA-argF)U169,  $\lambda$ <sup>-</sup> (Invitrogen)

**294-Cre:** Diese Zellen exprimieren die Cre Rekombinase, deren kodierende Sequenz in den *lacZ* Locus des *E. coli* Stamms MM294 integriert wurde (Genebridges) [155].

**294-FLP:** Diese Zellen exprimieren die FLP Rekombinase, deren kodierende Sequenz in den *lacZ* Locus des *E. coli* Stamms MM294 integriert wurde (Genebridges) [155].

**TransforMax<sup>TM</sup> EC100D<sup>TM</sup> *pir*-116:** elektrokompetente *E. coli*, die das *pir* Genprodukt exprimieren und zur Replikation von Plasmiden dienen, die den R6K<sub>Yori</sub> enthalten; Genotyp: F<sup>-</sup> *mcrA*  $\Delta$ (*mrr*-*hsdRMS*-*mcrBC*)  $\phi$ 80d*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ *lacX74* *recA1* *endA1* *araD139*  $\Delta$ (*ara*, *leu*)7697 *galU* *galK*  $\lambda$ <sup>-</sup> *rpsL* *nupG* *pir*-116(DHFR) (EPICENTRE® Biotechnologies).

### 5.9.3 Transformation von Bakterien

Bei der Transformation handelt es sich um das Einbringen von fremder DNA in Bakterien. Es wurde Plasmid DNA in die chemisch kompetenten *Escherichia coli* Bakterien DH5 $\alpha$ <sup>TM</sup>, 294-Cre und 294-FLP und elektrokompetente TransforMax<sup>TM</sup> EC100D<sup>TM</sup> *pir*-116 Bakterien eingebracht.

Für die Transformationsreaktion wurde die jeweilige Plasmid DNA zu den chemokompetenten *E.coli* Bakterien pipettiert und 30 min auf Eis inkubiert. Dann wurden die Bakterien 30 sec bei 42°C einem Hitzeschock ausgesetzt und mit LB-Medium versetzt. Elektrokompetente *E. coli* Bakterien wurden mit dem zugegebenen Plasmid in einer Elektroporationsküvette im BioRad Genpulsar II bei 1350 V, 600 mA und 25  $\mu$ F elektroporiert. Die transformierten Bakterien wurden dann zur Expression des jeweiligen Resistenzmarkers etwa 1 h bei 37°C geschüttelt. Zuletzt wurde eine entsprechende Menge der Bakteriensuspension auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen und ü.N. bei 37°C inkubiert. Am folgenden Tag wurden

einzelne Kolonien von den Platten in LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum, für das die transformierten Plasmide ein Resistenzgen tragen, gepickt.

#### 5.9.4 Verwendete Antibiotika Lösungen

**Ampicillin Stocklösung:** 50 mg Ampicillin/ml wurden in MilliQ gelöst und anschließend sterilfiltriert. Die Endkonzentration im LB-Medium betrug 100 µg/ml.

**Chloramphenicol Stocklösung:** 50 mg Chloramphenicol/ml wurden in Ethanol gelöst. Die Endkonzentration im LB-Medium betrug 15 µg/ml.

**Kanamycin Stocklösung:** 25 mg Kanamycin/ml wurden in MilliQ gelöst und anschließend sterilfiltriert. Die Endkonzentration im LB-Medium betrug 50 µg/ml zur Selektion von Plasmiden mit *neo* Selektionskassette und 15 µg/ml zur Selektion von BACs mit *neo* Selektionskassette.

**Tetracyclin Stocklösung:** 5 mg Tetracyclin/ml wurden in Ethanol gelöst. Die Endkonzentration im LB-Medium betrug 3 µg/ml.

#### 5.10 Verwendete BACs, genomische DNA und Plasmide

##### BACs

**RPCIB731H13112Q:** Genomischer Klon, der das murine Eosinophile Peroxidase Gen (*Epx*) enthält und zur Herstellung eines Cre Transgens mittels ET Klonierung verwendet wurde (RZPD).

**RPCIB753H18745Q:** Genomischer Klon, der das humane Retinoblastom 1 Gen (*RB1*) enthält und als PCR Matrize zur Herstellung der Retinoblastom basierenden NMD Kassetten verwendet wurde (RZPD).

##### Genomische DNA

**Genomische DNA von K14crem Mäusen:** Diese Mauslinie exprimiert unter der Kontrolle des humanen K14 Keratin Promotors ein Fusionsprotein aus Cre Rekombinase mit der Liganden bindenden Domäne des mutierten humanen Östrogenrezeptors (ERT2). Die LBD umfasst die Aminosäuren 288-594 (Müller, W., unveröffentlicht). Die genomische DNA von K14crem Mäusen diente als PCR Matrize zur Herstellung der ERT2 Fragmente für bifunktionale Cre Expressionskonstrukte.

##### Plasmide

**pBKEF-NLSCre:** Vektor, der das offene Leseraster der Cre Rekombinase mit Kozaksequenz unter der Kontrolle des EF1-alpha Promotors und ein zusätzliches Kernlokalisierungssignal vom SV40 large T-Antigen enthält. Dieser Vektor diente als

Positivkontrolle bei der Funktionsprüfung der bifunktionalen und bicistronischen Cre Expressionsvektoren.

**pBKK14-Cre19-PR676-914-bpA:** Vektor, der das Gen für Cre beginnend mit der Aminosäure 19 enthält, das C-terminal mit der Liganden bindenden Domäne des humanen Progesteronrezeptors (PR) fusioniert wurde. Die LBD umfasst die Aminosäuren 676-914. Dieser Vektor diente als PCR Matrize zur Herstellung des PR Fragments für das bifunktionale Cre-FRT-PR-ERT2-FRT Konstrukt (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Thomas Wunderlich, Institut für Genetik, Köln).

**pBluescriptIIcreFRTERT2FRTNLSneo:** Klonierungsvektor, der das induzierbare bifunktionale Cre Expressionskonstrukt mit *neo* Kasette enthält [152]. Der Vektor diente als Ausgangspunkt für die Herstellung der neuen bifunktionalen Cre Expressionsvektoren.

**pcCre-FRT-ERT2-FRT:** Vektor, der das induzierbare bifunktionale Cre Expressionskonstrukt mit *neo* Kasette enthält (regulierbar zu konstitutiv aktiv) [152].

**pcCre-FRT-NLS:** Vektor, der das konstitutiv aktive Cre Expressionkonstrukt mit *neo* Kasette enthält [152].

**pcDNA3.1(+/-):** Expressionsvektor für stabile und transiente Expression in Säugerzellen (Invitrogen). Dieser Vektor diente zur Klonierung und für die nachfolgenden Funktionsanalysen der bifunktionalen Cre Expressionskonstrukte.

**pCMVluc-lambdaIn2-m2A:** Vektor, der ein *firefly* Luciferase Reportergen enthält, das durch ein Intron aus dem *lambda2* Gen in zwei Exons geteilt wird. Der Vektor diente zur Herstellung des pGI2luc-lambdaIn2 NMD Testsystems (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Siegfried Weiß, Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung, Braunschweig).

**pPCR-Script Amp SK(+):** Klonierungsvektor, in den das synthetisierte DNA Fragment, das die Rekombinase Zielsequenzen in der für ihre Funktionalität notwendigen Orientierung enthält, kloniert wurde (Stratagene). Dieser Vektor diente anschließend dazu, die NMD Kassetten mit den flankierenden Erkennungssequenzen zu versehen und als PCR Matrize zur Herstellung der NMD Kassetten, die nur von einem Zielsequenztyp flankiert werden.

**pCR4-TOPO®:** TA-Klonierungsvektor für PCR Produkte (Invitrogen).

**pEGFP-N1:** Vektor, der ein eGFP Reportergen enthält. Der Vektor diente zur Herstellung der bicistronischen Cre Expressionsvektoren.

**pGEM®-T Easy:** TA-Klonierungsvektor für PCR Produkte (Promega).

**pGL2-Promoter:** Vektor, der ein *firefly* Luciferase Reportergen unter der Kontrolle des SV40 Promotors enthält (Promega). Der Vektor diente zur Herstellung des pGI2luc-lambdaIn2 NMD Testsystems.

**pGL3-Promotor:** Vektor, der das SV40 poly(A) Signal und ein *firefly* Luciferase Reportergen enthält (Promega). Dieser Vektor diente als PCR Matrize zur Herstellung des

NLS-SV40pA-FRT Fragments für das bifunktionale Cre-FRT-NLS-FRT Konstrukt (konstitutiv aktiv zu regulierbar) und zur Co-Transfektion von Zellen der CV1-B5 Linie [110].

**pGL4.76[hRluc/Hygro]:** Vektor, der das *Renilla* Luciferase Reportergen und ein Hygromycins Resistenzgen enthält (Promega). Der Vektor diente in stabilen Transfektionen zur Herstellung einer ES-Reporter-Zelllinie.

**pKozakcre:** Vektor, der das offene Leseraster der Cre Rekombinase mit einer 5'-Kozaksequenz enthält. Dieser Vektor diente als PCR Matrize zur Herstellung des Cre Fragments für das bifunktionale F5-ERT2-Cre-ERT2-FRT Konstrukt.

**pMDIS:** Vektor, der ein *Renilla* Luciferase Reportergen unter der Kontrolle des SV40 Promotors enthält. Dieser Vektor diente zur Co-Transfektion von Zellen der 293A Zelllinie (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Tobias May, Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung, Braunschweig).

**pMOD™4:** Vektor, der statt des colEI *ori* (*origin of replication*) den R6Ky *ori* enthält (EPICENTRE® Biotechnologies). Die Replikation von dem *ori* ist abhängig vom *pir* Genprodukt. Der Vektor diente zur Subklonierung des Cre-FRT-ERT2-FRT Expressionskonstrukts mit *neo* Selektionskassette und wurde anschließend als PCR Matrize zur Herstellung des PCR Produkts für die ET Klonierung eingesetzt.

**pNLS-Cre:** Vektor, der das offene Leseraster der Cre Rekombinase mit N-terminalem Kernlokalisierungssignal enthält. Dieser Vektor diente als PCR Matrize zur Herstellung der Cre Fragmente für die Konstrukte aus NLS-Cre, die durch ein 2A Peptid mit eGFP fusioniert wurden bzw. umgekehrt.

**pNN-Cre19-ER288-594:** Vektor, der das Gen für Cre beginnend mit der Aminosäure 19 enthält, das C-terminal mit der Liganden bindenden Domäne des mutierten humanen Östrogenrezeptors (ERT2) fusioniert wurde. Die LBD umfasst die Aminosäuren 288-594. Dieser Vektor diente als Positivkontrolle bei der Funktionsprüfung der bifunktionalen Cre Expressionsvektoren (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Thomas Wunderlich, Institut für Genetik, Köln).

**pSC101-BAD-gba:** Vektor, der für die Rekombinationsproteine RecE und RecT kodiert, die beim ET Klonieren die Rekombinationsreaktion vermitteln (Genebridges).

**Δ61 *gene targeting* Plasmid:** Vektor, der das *gene targeting* Konstrukt zur Einführung einer Stopmutation (Δ61) in das Exon 14 des β<sub>7</sub>-Integrin Gens enthält [153]. Der Vektor diente als PCR Matrize zur Herstellung der β<sub>7</sub>-Integrin basierenden NMD Kassetten.

## 6. Literaturverzeichnis

1. *Finishing the euchromatic sequence of the human genome*. Nature, 2004. **431**(7011): p. 931-45.
2. Stanford, W.L., J.B. Cohn, and S.P. Cordes, *Gene-trap mutagenesis: past, present and beyond*. Nat Rev Genet, 2001. **2**(10): p. 756-68.
3. van der Weyden, L., D.J. Adams, and A. Bradley, *Tools for targeted manipulation of the mouse genome*. Physiol Genomics, 2002. **11**(3): p. 133-64.
4. Brinster, R.L., et al., *Somatic expression of herpes thymidine kinase in mice following injection of a fusion gene into eggs*. Cell, 1981. **27**(1 Pt 2): p. 223-31.
5. Palmiter, R.D. and R.L. Brinster, *Germ-line transformation of mice*. Annu Rev Genet, 1986. **20**: p. 465-99.
6. Bockamp, E., et al., *Of mice and models: improved animal models for biomedical research*. Physiol Genomics, 2002. **11**(3): p. 115-32.
7. Garcia-Otin, A.L. and F. Guillou, *Mammalian genome targeting using site-specific recombinases*. Front Biosci, 2006. **11**: p. 1108-36.
8. Evans, M.J. and M.H. Kaufman, *Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos*. Nature, 1981. **292**(5819): p. 154-6.
9. Bradley, A., et al., *Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines*. Nature, 1984. **309**(5965): p. 255-6.
10. Kuehn, M.R., et al., *A potential animal model for Lesch-Nyhan syndrome through introduction of HPRT mutations into mice*. Nature, 1987. **326**(6110): p. 295-8.
11. Thomas, K.R. and M.R. Capecchi, *Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells*. Cell, 1987. **51**(3): p. 503-12.
12. Kaul, A., et al., *Myf-5 revisited: loss of early myotome formation does not lead to a rib phenotype in homozygous Myf-5 mutant mice*. Cell, 2000. **102**(1): p. 17-9.
13. Nagy, A., et al., *Dissecting the role of N-myc in development using a single targeting vector to generate a series of alleles*. Curr Biol, 1998. **8**(11): p. 661-4.
14. Olson, E.N., et al., *Know your neighbors: three phenotypes in null mutants of the myogenic bHLH gene MRF4*. Cell, 1996. **85**(1): p. 1-4.
15. Pham, C.T., et al., *Long-range disruption of gene expression by a selectable marker cassette*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(23): p. 13090-5.
16. Wilson, L., et al., *Random mutagenesis of proximal mouse chromosome 5 uncovers predominantly embryonic lethal mutations*. Genome Res, 2005. **15**(8): p. 1095-105.
17. Sauer, B. and N. Henderson, *Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(14): p. 5166-70.
18. Austin, S., M. Ziese, and N. Sternberg, *A novel role for site-specific recombination in maintenance of bacterial replicons*. Cell, 1981. **25**(3): p. 729-36.
19. Hoess, R.H., M. Ziese, and N. Sternberg, *P1 site-specific recombination: nucleotide sequence of the recombining sites*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1982. **79**(11): p. 3398-402.
20. Van Duyne, G.D., *A structural view of cre-loxp site-specific recombination*. Annu Rev Biophys Biomol Struct, 2001. **30**: p. 87-104.
21. Ghosh, K. and G.D. Van Duyne, *Cre-loxP biochemistry*. Methods, 2002. **28**(3): p. 374-83.
22. Andrews, B.J., et al., *The FLP recombinase of the 2 micron circle DNA of yeast: interaction with its target sequences*. Cell, 1985. **40**(4): p. 795-803.
23. McLeod, M., S. Craft, and J.R. Broach, *Identification of the crossover site during FLP-mediated recombination in the Saccharomyces cerevisiae plasmid 2 microns circle*. Mol Cell Biol, 1986. **6**(10): p. 3357-67.
24. Volkert, F.C., et al., *Survival strategies of the yeast plasmid two-micron circle*. Basic Life Sci, 1986. **40**: p. 375-96.
25. Chen, Y. and P.A. Rice, *New insight into site-specific recombination from Flp recombinase-DNA structures*. Annu Rev Biophys Biomol Struct, 2003. **32**: p. 135-59.

26. Branda, C.S. and S.M. Dymecki, *Talking about a revolution: The impact of site-specific recombinases on genetic analyses in mice*. Dev Cell, 2004. **6**(1): p. 7-28.
27. Ringrose, L., et al., *Comparative kinetic analysis of FLP and cre recombinases: mathematical models for DNA binding and recombination*. J Mol Biol, 1998. **284**(2): p. 363-84.
28. Koresawa, Y., et al., *A new Cre recombinase gene based on optimal codon usage in mammals: a powerful material for organ-specific gene targeting*. Transplant Proc, 2000. **32**(7): p. 2516-7.
29. Shimshek, D.R., et al., *Codon-improved Cre recombinase (iCre) expression in the mouse*. Genesis, 2002. **32**(1): p. 19-26.
30. Buchholz, F., et al., *Different thermostabilities of FLP and Cre recombinases: implications for applied site-specific recombination*. Nucleic Acids Res, 1996. **24**(21): p. 4256-62.
31. Buchholz, F., P.O. Angrand, and A.F. Stewart, *Improved properties of FLP recombinase evolved by cycling mutagenesis*. Nat Biotechnol, 1998. **16**(7): p. 657-62.
32. Andreas, S., et al., *Enhanced efficiency through nuclear localization signal fusion on phage PhiC31-integrase: activity comparison with Cre and FLPe recombinase in mammalian cells*. Nucleic Acids Res, 2002. **30**(11): p. 2299-306.
33. Farley, F.W., et al., *Widespread recombinase expression using FLPeR (flipper) mice*. Genesis, 2000. **28**(3-4): p. 106-10.
34. Rodriguez, C.I., et al., *High-efficiency deleter mice show that FLPe is an alternative to Cre-loxP*. Nat Genet, 2000. **25**(2): p. 139-40.
35. Raymond, C.S. and P. Soriano, *High-efficiency FLP and PhiC31 site-specific recombination in mammalian cells*. PLoS ONE, 2007. **2**(1): p. e162.
36. Le, Y., et al., *Nuclear targeting determinants of the phage P1 cre DNA recombinase*. Nucleic Acids Res, 1999. **27**(24): p. 4703-9.
37. Moore, M.S. and G. Blobel, *The two steps of nuclear import, targeting to the nuclear envelope and translocation through the nuclear pore, require different cytosolic factors*. Cell, 1992. **69**(6): p. 939-50.
38. Gu, H., Y.R. Zou, and K. Rajewsky, *Independent control of immunoglobulin switch recombination at individual switch regions evidenced through Cre-loxP-mediated gene targeting*. Cell, 1993. **73**(6): p. 1155-64.
39. Schaft, J., et al., *Efficient FLP recombination in mouse ES cells and oocytes*. Genesis, 2001. **31**(1): p. 6-10.
40. Kozak, M., *Compilation and analysis of sequences upstream from the translational start site in eukaryotic mRNAs*. Nucleic Acids Res, 1984. **12**(2): p. 857-72.
41. Schnutgen, F., et al., *Engineering embryonic stem cells with recombinase systems*. Methods Enzymol, 2006. **420**: p. 100-36.
42. Albert, H., et al., *Site-specific integration of DNA into wild-type and mutant lox sites placed in the plant genome*. Plant J, 1995. **7**(4): p. 649-59.
43. Araki, K., M. Araki, and K. Yamamura, *Targeted integration of DNA using mutant lox sites in embryonic stem cells*. Nucleic Acids Res, 1997. **25**(4): p. 868-72.
44. Senecoff, J.F., P.J. Rossmeissl, and M.M. Cox, *DNA recognition by the FLP recombinase of the yeast 2 mu plasmid. A mutational analysis of the FLP binding site*. J Mol Biol, 1988. **201**(2): p. 405-21.
45. Oberdoerffer, P., et al., *Unidirectional Cre-mediated genetic inversion in mice using the mutant loxP pair lox66/lox71*. Nucleic Acids Res, 2003. **31**(22): p. e140.
46. Zhang, Z. and B. Lutz, *Cre recombinase-mediated inversion using lox66 and lox71: method to introduce conditional point mutations into the CREB-binding protein*. Nucleic Acids Res, 2002. **30**(17): p. e90.
47. Hoess, R.H., A. Wierzbicki, and K. Abremski, *The role of the loxP spacer region in P1 site-specific recombination*. Nucleic Acids Res, 1986. **14**(5): p. 2287-300.
48. Bethke, B. and B. Sauer, *Segmental genomic replacement by Cre-mediated recombination: genotoxic stress activation of the p53 promoter in single-copy transformants*. Nucleic Acids Res, 1997. **25**(14): p. 2828-34.



49. Schlake, T. and J. Bode, *Use of mutated FLP recognition target (FRT) sites for the exchange of expression cassettes at defined chromosomal loci*. Biochemistry, 1994. **33**(43): p. 12746-51.
50. Bode, J., et al., *The transgeneticist's toolbox: novel methods for the targeted modification of eukaryotic genomes*. Biol Chem, 2000. **381**(9-10): p. 801-13.
51. Baer, A. and J. Bode, *Coping with kinetic and thermodynamic barriers: RMCE, an efficient strategy for the targeted integration of transgenes*. Curr Opin Biotechnol, 2001. **12**(5): p. 473-80.
52. Kolb, A.F., *Selection-marker-free modification of the murine beta-casein gene using a lox2272 [correction of lox2722] site*. Anal Biochem, 2001. **290**(2): p. 260-71.
53. Schnutgen, F., et al., *A directional strategy for monitoring Cre-mediated recombination at the cellular level in the mouse*. Nat Biotechnol, 2003. **21**(5): p. 562-5.
54. Feng, Y.Q., et al., *Site-specific chromosomal integration in mammalian cells: highly efficient CRE recombinase-mediated cassette exchange*. J Mol Biol, 1999. **292**(4): p. 779-85.
55. Lee, G. and I. Saito, *Role of nucleotide sequences of loxP spacer region in Cre-mediated recombination*. Gene, 1998. **216**(1): p. 55-65.
56. Langer, S.J., et al., *A genetic screen identifies novel non-compatible loxP sites*. Nucleic Acids Res, 2002. **30**(14): p. 3067-77.
57. Nagy, A., *Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring*. Genesis, 2000. **26**(2): p. 99-109.
58. Sauer, B., *Identification of cryptic lox sites in the yeast genome by selection for Cre-mediated chromosome translocations that confer multiple drug resistance*. J Mol Biol, 1992. **223**(4): p. 911-28.
59. Thyagarajan, B., et al., *Mammalian genomes contain active recombinase recognition sites*. Gene, 2000. **244**(1-2): p. 47-54.
60. Loonstra, A., et al., *Growth inhibition and DNA damage induced by Cre recombinase in mammalian cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(16): p. 9209-14.
61. Thorpe, H.M. and M.C. Smith, *In vitro site-specific integration of bacteriophage DNA catalyzed by a recombinase of the resolvase/invertase family*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(10): p. 5505-10.
62. Groth, A.C., et al., *A phage integrase directs efficient site-specific integration in human cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(11): p. 5995-6000.
63. Hollis, R.P., et al., *Phage integrases for the construction and manipulation of transgenic mammals*. Reprod Biol Endocrinol, 2003. **1**: p. 79.
64. Thyagarajan, B., et al., *Site-specific genomic integration in mammalian cells mediated by phage phiC31 integrase*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(12): p. 3926-34.
65. Belteki, G., et al., *Site-specific cassette exchange and germline transmission with mouse ES cells expressing phiC31 integrase*. Nat Biotechnol, 2003. **21**(3): p. 321-4.
66. Thyagarajan, B., et al., *Creation of engineered human embryonic stem cell lines using phiC31 integrase*. Stem Cells, 2008. **26**(1): p. 119-26.
67. Siegal, M.L. and D.L. Hartl, *Transgene Coplacement and high efficiency site-specific recombination with the Cre/loxP system in Drosophila*. Genetics, 1996. **144**(2): p. 715-26.
68. Dong, J. and G.W. Stuart, *Transgene manipulation in zebrafish by using recombinases*. Methods Cell Biol, 2004. **77**: p. 363-79.
69. Werdien, D., G. Peiler, and G.U. Ryffel, *FLP and Cre recombinase function in Xenopus embryos*. Nucleic Acids Res, 2001. **29**(11): p. E53-3.
70. Srivastava, V. and D.W. Ow, *Marker-free site-specific gene integration in plants*. Trends Biotechnol, 2004. **22**(12): p. 627-9.
71. Fukushige, S. and B. Sauer, *Genomic targeting with a positive-selection lox integration vector allows highly reproducible gene expression in mammalian cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(17): p. 7905-9.
72. Baubonis, W. and B. Sauer, *Genomic targeting with purified Cre recombinase*. Nucleic Acids Res, 1993. **21**(9): p. 2025-9.

73. Orban, P.C., D. Chui, and J.D. Marth, *Tissue- and site-specific DNA recombination in transgenic mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(15): p. 6861-5.
74. Ringrose, L., et al., *Quantitative comparison of DNA looping in vitro and in vivo: chromatin increases effective DNA flexibility at short distances*. EMBO J, 1999. **18**(23): p. 6630-41.
75. Gu, H., et al., *Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting*. Science, 1994. **265**(5168): p. 103-6.
76. Uno, S., et al., *Balancer-Cre transgenic mouse germ cells direct the incomplete resolution of a tri-loxP-targeted Cyp1a1 allele, producing a conditional knockout allele*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **312**(2): p. 494-9.
77. R.M. Torres and R. Kühn, *Laboratory protocols for conditional gene targeting*. Oxford University Press. 1997.
78. Peitz, M., et al., *Ability of the hydrophobic FGF and basic TAT peptides to promote cellular uptake of recombinant Cre recombinase: a tool for efficient genetic engineering of mammalian genomes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(7): p. 4489-94.
79. Zheng, B., et al., *Engineering mouse chromosomes with Cre-loxP: range, efficiency, and somatic applications*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(2): p. 648-55.
80. Vooijs, M., J. Jonkers, and A. Berns, *A highly efficient ligand-regulated Cre recombinase mouse line shows that LoxP recombination is position dependent*. EMBO Rep, 2001. **2**(4): p. 292-7.
81. Jo, D., et al., *Epigenetic regulation of gene structure and function with a cell-permeable Cre recombinase*. Nat Biotechnol, 2001. **19**(10): p. 929-33.
82. Sakai, K. and J. Miyazaki, *A transgenic mouse line that retains Cre recombinase activity in mature oocytes irrespective of the cre transgene transmission*. Biochem Biophys Res Commun, 1997. **237**(2): p. 318-24.
83. Takeuchi, T., et al., *Flp recombinase transgenic mice of C57BL/6 strain for conditional gene targeting*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **293**(3): p. 953-7.
84. Rickert, R.C., J. Roes, and K. Rajewsky, *B lymphocyte-specific, Cre-mediated mutagenesis in mice*. Nucleic Acids Res, 1997. **25**(6): p. 1317-8.
85. Scholten, J., et al., *Mast cell-specific Cre/loxP-mediated recombination in vivo*. Transgenic Res, 2008. **17**(2): p. 307-15.
86. Soriano, P., *Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain*. Nat Genet, 1999. **21**(1): p. 70-1.
87. Mao, X., et al., *Activation of EGFP expression by Cre-mediated excision in a new ROSA26 reporter mouse strain*. Blood, 2001. **97**(1): p. 324-6.
88. Awatramani, R., et al., *An Flp indicator mouse expressing alkaline phosphatase from the ROSA26 locus*. Nat Genet, 2001. **29**(3): p. 257-9.
89. Rivkin, E. and S.P. Cordes, *Generation of a transgenic mouse line expressing GFP-Cre protein from a Hoxb4 neural enhancer*. Genesis, 2008. **46**(2): p. 119-24.
90. Vincent, S.D. and E.J. Robertson, *Targeted insertion of an IRES Cre into the Hnf4alpha locus: Cre-mediated recombination in the liver, kidney, and gut epithelium*. Genesis, 2004. **39**(3): p. 206-11.
91. Rubtsov, Y.P., et al., *Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces*. Immunity, 2008. **28**(4): p. 546-58.
92. Mizuguchi, H., et al., *IRES-dependent second gene expression is significantly lower than cap-dependent first gene expression in a bicistronic vector*. Mol Ther, 2000. **1**(4): p. 376-82.
93. de Felipe, P., *Skipping the co-expression problem: the new 2A "CHYSEL" technology*. Genet Vaccines Ther, 2004. **2**(1): p. 13.
94. Guo, C., W. Yang, and C.G. Lobe, *A Cre recombinase transgene with mosaic, widespread tamoxifen-inducible action*. Genesis, 2002. **32**(1): p. 8-18.
95. Metzger, D., M. Li, and P. Chambon, *Targeted somatic mutagenesis in the mouse epidermis*. Methods Mol Biol, 2005. **289**: p. 329-40.
96. Tronche, F., et al., *When reverse genetics meets physiology: the use of site-specific recombinases in mice*. FEBS Lett, 2002. **529**(1): p. 116-21.

97. Kühn, R., et al., *Inducible gene targeting in mice*. Science, 1995. **269**(5229): p. 1427-9.
98. Lewandoski, M., *Conditional control of gene expression in the mouse*. Nat Rev Genet, 2001. **2**(10): p. 743-55.
99. Garcia, E.L. and A.A. Mills, *Getting around lethality with inducible Cre-mediated excision*. Semin Cell Dev Biol, 2002. **13**(2): p. 151-8.
100. Zhang, Y., et al., *Inducible site-directed recombination in mouse embryonic stem cells*. Nucleic Acids Res, 1996. **24**(4): p. 543-8.
101. Metzger, D. and P. Chambon, *Site- and time-specific gene targeting in the mouse*. Methods, 2001. **24**(1): p. 71-80.
102. Moras, D. and H. Gronemeyer, *The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function*. Curr Opin Cell Biol, 1998. **10**(3): p. 384-91.
103. Schwenk, F., et al., *Temporally and spatially regulated somatic mutagenesis in mice*. Nucleic Acids Res, 1998. **26**(6): p. 1427-32.
104. Wurtz, J.M., et al., *A canonical structure for the ligand-binding domain of nuclear receptors*. Nat Struct Biol, 1996. **3**(2): p. 206.
105. Picard, D., *Regulation of protein function through expression of chimaeric proteins*. Curr Opin Biotechnol, 1994. **5**(5): p. 511-5.
106. Hayashi, S. and A.P. McMahon, *Efficient recombination in diverse tissues by a tamoxifen-inducible form of Cre: a tool for temporally regulated gene activation/inactivation in the mouse*. Dev Biol, 2002. **244**(2): p. 305-18.
107. Metzger, D., et al., *Conditional site-specific recombination in mammalian cells using a ligand-dependent chimeric Cre recombinase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(15): p. 6991-5.
108. Logie, C. and A.F. Stewart, *Ligand-regulated site-specific recombination*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(13): p. 5940-4.
109. Jaisser, F., *Inducible gene expression and gene modification in transgenic mice*. J Am Soc Nephrol, 2000. **11 Suppl 16**: p. S95-S100.
110. Kellendonk, C., et al., *Regulation of Cre recombinase activity by the synthetic steroid RU 486*. Nucleic Acids Res, 1996. **24**(8): p. 1404-11.
111. Feil, R., et al., *Regulation of Cre recombinase activity by mutated estrogen receptor ligand-binding domains*. Biochem Biophys Res Commun, 1997. **237**(3): p. 752-7.
112. Danielian, P.S., et al., *Identification of residues in the estrogen receptor that confer differential sensitivity to estrogen and hydroxytamoxifen*. Mol Endocrinol, 1993. **7**(2): p. 232-40.
113. Feil, R., et al., *Ligand-activated site-specific recombination in mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(20): p. 10887-90.
114. Vasioukhin, V., et al., *The magical touch: genome targeting in epidermal stem cells induced by tamoxifen application to mouse skin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(15): p. 8551-6.
115. Indra, A.K., et al., *Temporally-controlled site-specific mutagenesis in the basal layer of the epidermis: comparison of the recombinase activity of the tamoxifen-inducible Cre-ER(T) and Cre-ER(T2) recombinases*. Nucleic Acids Res, 1999. **27**(22): p. 4324-7.
116. Casanova, E., et al., *ER-based double iCre fusion protein allows partial recombination in forebrain*. Genesis, 2002. **34**(3): p. 208-14.
117. el Marjou, F., et al., *Tissue-specific and inducible Cre-mediated recombination in the gut epithelium*. Genesis, 2004. **39**(3): p. 186-93.
118. Schuler, M., et al., *Temporally controlled targeted somatic mutagenesis in skeletal muscles of the mouse*. Genesis, 2005. **41**(4): p. 165-70.
119. Jullien, N., et al., *Use of ERT2-iCre-ERT2 for conditional transgenesis*. Genesis, 2008. **46**(4): p. 193-9.
120. Brake, R.L., P.J. Simmons, and C.G. Begley, *Cross-contamination with tamoxifen induces transgene expression in non-exposed inducible transgenic mice*. Genet Mol Res, 2004. **3**(4): p. 456-62.

121. Logie, C., et al., *Positive and negative discrimination of estrogen receptor agonists and antagonists using site-specific DNA recombinase fusion proteins*. Mol Endocrinol, 1998. **12**(8): p. 1120-32.
122. Hunter, N.L., et al., *Ligand-activated Flpe for temporally regulated gene modifications*. Genesis, 2005. **41**(3): p. 99-109.
123. Vegeto, E., et al., *The mechanism of RU486 antagonism is dependent on the conformation of the carboxy-terminal tail of the human progesterone receptor*. Cell, 1992. **69**(4): p. 703-13.
124. Kellendonk, C., et al., *Inducible site-specific recombination in the brain*. J Mol Biol, 1999. **285**(1): p. 175-82.
125. Minamino, T., et al., *Inducible gene targeting in postnatal myocardium by cardiac-specific expression of a hormone-activated Cre fusion protein*. Circ Res, 2001. **88**(6): p. 587-92.
126. Wunderlich, F.T., et al., *New variants of inducible Cre recombinase: a novel mutant of Cre-PR fusion protein exhibits enhanced sensitivity and an expanded range of inducibility*. Nucleic Acids Res, 2001. **29**(10): p. E47.
127. Gao, Y. and R.V. Short, *Fertility control in laboratory rats and mice after feeding with the antigestagen RU486*. J Reprod Fertil, 1994. **101**(2): p. 477-81.
128. Friedrich, G. and P. Soriano, *Promoter traps in embryonic stem cells: a genetic screen to identify and mutate developmental genes in mice*. Genes Dev, 1991. **5**(9): p. 1513-23.
129. Skarnes, W.C., B.A. Auerbach, and A.L. Joyner, *A gene trap approach in mouse embryonic stem cells: the lacZ reported is activated by splicing, reflects endogenous gene expression, and is mutagenic in mice*. Genes Dev, 1992. **6**(6): p. 903-18.
130. McClive, P., et al., *Gene trap integrations expressed in the developing heart: insertion site affects splicing of the PT1-ATG vector*. Dev Dyn, 1998. **212**(2): p. 267-76.
131. Stanford, W.L., et al., *Gene trapping in embryonic stem cells*. Methods Enzymol, 2006. **420**: p. 136-62.
132. Niwa, H., et al., *An efficient gene-trap method using poly A trap vectors and characterization of gene-trap events*. J Biochem, 1993. **113**(3): p. 343-9.
133. Zambrowicz, B.P., et al., *Disruption and sequence identification of 2,000 genes in mouse embryonic stem cells*. Nature, 1998. **392**(6676): p. 608-11.
134. Shigeoka, T., M. Kawaichi, and Y. Ishida, *Suppression of nonsense-mediated mRNA decay permits unbiased gene trapping in mouse embryonic stem cells*. Nucleic Acids Res, 2005. **33**(2): p. e20.
135. Maquat, L.E., *Nonsense-mediated mRNA decay: splicing, translation and mRNP dynamics*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. **5**(2): p. 89-99.
136. Li, X., W. Wang, and T. Lufkin, *Dicistronic LacZ and alkaline phosphatase reporter constructs permit simultaneous histological analysis of expression from multiple transgenes*. Biotechniques, 1997. **23**(5): p. 874-8, 880, 882.
137. Schnutgen, F., et al., *Genomewide production of multipurpose alleles for the functional analysis of the mouse genome*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(20): p. 7221-6.
138. Schnutgen, F., *Generation of multipurpose alleles for the functional analysis of the mouse genome*. Brief Funct Genomic Proteomic, 2006. **5**(1): p. 15-8.
139. Nord, A.S., et al., *The International Gene Trap Consortium Website: a portal to all publicly available gene trap cell lines in mouse*. Nucleic Acids Res, 2006. **34**(Database issue): p. D642-8.
140. Morrison, M., K.S. Harris, and M.B. Roth, *smg mutants affect the expression of alternatively spliced SR protein mRNAs in Caenorhabditis elegans*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(18): p. 9782-5.
141. Maquat, L.E., *Nonsense-mediated mRNA decay in mammals*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 9): p. 1773-6.
142. Peltz, S.W., et al., *Nonsense-mediated mRNA decay in yeast*. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol, 1994. **47**: p. 271-98.

143. Rodriguez-Gabriel, M.A., et al., *Upf1, an RNA helicase required for nonsense-mediated mRNA decay, modulates the transcriptional response to oxidative stress in fission yeast*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(17): p. 6347-56.
144. Cali, B.M., et al., *smg-7 is required for mRNA surveillance in Caenorhabditis elegans*. Genetics, 1999. **151**(2): p. 605-16.
145. Gatfield, D., et al., *Nonsense-mediated mRNA decay in Drosophila: at the intersection of the yeast and mammalian pathways*. EMBO J, 2003. **22**(15): p. 3960-70.
146. Dalmay, T., et al., *SDE3 encodes an RNA helicase required for post-transcriptional gene silencing in Arabidopsis*. EMBO J, 2001. **20**(8): p. 2069-78.
147. Zhang, J. and L.E. Maquat, *Evidence that translation reinitiation abrogates nonsense-mediated mRNA decay in mammalian cells*. EMBO J, 1997. **16**(4): p. 826-33.
148. Maquat, L.E., *Nonsense-mediated mRNA decay: a comparative analysis of different species*. Curr Genomics, 2004. **5**: p. 175-190.
149. Lejeune, F., X. Li, and L.E. Maquat, *Nonsense-mediated mRNA decay in mammalian cells involves decapping, deadenylation, and exonucleolytic activities*. Mol Cell, 2003. **12**(3): p. 675-87.
150. Holbrook, J.A., et al., *Nonsense-mediated decay approaches the clinic*. Nat Genet, 2004. **36**(8): p. 801-8.
151. Kwan, K.M., *Conditional alleles in mice: practical considerations for tissue-specific knockouts*. Genesis, 2002. **32**(2): p. 49-62.
152. Nawrath, K., *Entwicklung von vielseitig anwendbaren Rekombinasemodulen, in Fachbereich Biologie der Naturwissenschaftlichen Fakultät 2004*, Technische Universität Carolo-Wilhelmina: Braunschweig.
153. Kochut, A., *Analyse von Mausmutanten mit gezielten Veränderungen im  $\beta$ 7-Integrin Gen, in Fachbereich Biologie der Naturwissenschaftlichen Fakultät 2004*, Technische Universität Carolo-Wilhelmina: Braunschweig.
154. Hoff, H., *System zur lokalen Geninaktivierung in der Epidermis der Maus, in Fachbereich Biologie an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät. 1999*, Universität zu Köln: Köln.
155. Buchholz, F., P.O. Angrand, and A.F. Stewart, *A simple assay to determine the functionality of Cre or FLP recombination targets in genomic manipulation constructs*. Nucleic Acids Res, 1996. **24**(15): p. 3118-9.
156. Kolb, A.F., et al., *Insertion of a foreign gene into the beta-casein locus by Cre-mediated site-specific recombination*. Gene, 1999. **227**(1): p. 21-31.
157. Constien, R., et al., *Characterization of a novel EGFP reporter mouse to monitor Cre recombination as demonstrated by a Tie2 Cre mouse line*. Genesis, 2001. **30**(1): p. 36-44.
158. Martin, C.S., et al., *Dual luminescence-based reporter gene assay for luciferase and beta-galactosidase*. Biotechniques, 1996. **21**(3): p. 520-4.
159. Denzler, K.L., et al., *The murine eosinophil peroxidase gene (Epx) maps to chromosome 11*. Mamm Genome, 1997. **8**(5): p. 381-2.
160. Heintz, N., *BAC to the future: the use of bac transgenic mice for neuroscience research*. Nat Rev Neurosci, 2001. **2**(12): p. 861-70.
161. Zhang, Y., et al., *A new logic for DNA engineering using recombination in Escherichia coli*. Nat Genet, 1998. **20**(2): p. 123-8.
162. Osoegawa, K., et al., *Bacterial artificial chromosome libraries for mouse sequencing and functional analysis*. Genome Res, 2000. **10**(1): p. 116-28.
163. Guo, H., et al., *Specificity and efficiency of Cre-mediated recombination in Emx1-Cre knock-in mice*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **273**(2): p. 661-5.
164. Voiculescu, O., P. Charnay, and S. Schneider-Maunoury, *Expression pattern of a Krox-20/Cre knock-in allele in the developing hindbrain, bones, and peripheral nervous system*. Genesis, 2000. **26**(2): p. 123-6.
165. Saito, H., et al., *L7/Pcp-2-specific expression of Cre recombinase using knock-in approach*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **331**(4): p. 1216-21.

166. Gorski, J.A. and K.R. Jones, *Efficient bicistronic expression of cre in mammalian cells*. Nucleic Acids Res, 1999. **27**(9): p. 2059-61.
167. Michael, S.K., J. Brennan, and E.J. Robertson, *Efficient gene-specific expression of cre recombinase in the mouse embryo by targeted insertion of a novel IRES-Cre cassette into endogenous loci*. Mech Dev, 1999. **85**(1-2): p. 35-47.
168. Hafner, M., Nawrath, K., Müller, W., Kochut, A., *Inaktivierung und konditionale Mutagenese von Genen mittels Nonsense vermittelten Abbau von RNA*. 2007, Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung GmbH, Braunschweig: Deutschland.
169. Erika Hawkins, M.S., Michael Beck, M.S., Braeden Butler, B.S., and Keith Wood, Ph.D., *Increased Renilla Luciferase Sensitivity in the Dual-Luciferase® Reporter Assay System*. Promega Notes, 2003. **85**: p. 31-33.
170. Chen, C.Y. and A.B. Shyu, *Rapid deadenylation triggered by a nonsense codon precedes decay of the RNA body in a mammalian cytoplasmic nonsense-mediated decay pathway*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(14): p. 4805-13.
171. Economides, A.N., Valenzuela, D. M., Davis, S., Yancopoulos, G., *GENOME MUTATION BY INTRON INSERTION INTO AN EMBRYONIC STEM CELL GENOME*. 2007, Regeneron Pharmaceuticals, Inc., Tarrytown, NY: US.
172. Batt, D.B., Y. Luo, and G.G. Carmichael, *Polyadenylation and transcription termination in gene constructs containing multiple tandem polyadenylation signals*. Nucleic Acids Res, 1994. **22**(14): p. 2811-6.
173. Dorsky, D.I. and R.D. Harrington, *An indicator cell assay for T-cell tropic, macrophage-tropic, and primary isolates of HIV-1 based on green fluorescent protein*. J Acquir Immune Defic Syndr, 1999. **22**(3): p. 213-20.
174. Lanoix, J. and N.H. Acheson, *A rabbit beta-globin polyadenylation signal directs efficient termination of transcription of polyomavirus DNA*. EMBO J, 1988. **7**(8): p. 2515-22.
175. Dellaire, G. and P. Chartrand, *Direct evidence that transgene integration is random in murine cells, implying that naturally occurring double-strand breaks may be distributed similarly within the genome*. Radiat Res, 1998. **149**(4): p. 325-9.
176. Carter, M.S., et al., *A regulatory mechanism that detects premature nonsense codons in T-cell receptor transcripts in vivo is reversed by protein synthesis inhibitors in vitro*. J Biol Chem, 1995. **270**(48): p. 28995-9003.
177. Skandalis, A. and E. Uribe, *A survey of splice variants of the human hypoxanthine phosphoribosyl transferase and DNA polymerase beta genes: products of alternative or aberrant splicing?* Nucleic Acids Res, 2004. **32**(22): p. 6557-64.
178. Ionov, Y., et al., *Manipulation of nonsense mediated decay identifies gene mutations in colon cancer Cells with microsatellite instability*. Oncogene, 2004. **23**(3): p. 639-45.
179. Ivanov, I., et al., *Identifying candidate colon cancer tumor suppressor genes using inhibition of nonsense-mediated mRNA decay in colon cancer cells*. Oncogene, 2007. **26**(20): p. 2873-84.
180. Jo, D., et al., *Cell cycle-dependent transduction of cell-permeant Cre recombinase proteins*. J Cell Biochem, 2003. **89**(4): p. 674-87.
181. Tsang, T.C., et al., *Mammalian expression vector with two multiple cloning sites for expression of two foreign genes*. Biotechniques, 1997. **22**(1): p. 68.
182. Kemp, R., et al., *Elimination of background recombination: somatic induction of Cre by combined transcriptional regulation and hormone binding affinity*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(11): p. e92.
183. Bollati-Fogolin, M. and W. Müller, *Virus free, cell-based assay for the quantification of murine type I interferons*. J Immunol Methods, 2005. **306**(1-2): p. 169-75.
184. Stamm, S., et al., *ASD: a bioinformatics resource on alternative splicing*. Nucleic Acids Res, 2006. **34**(Database issue): p. D46-55.
185. Lallemand, Y., et al., *Maternally expressed PGK-Cre transgene as a tool for early and uniform activation of the Cre site-specific recombinase*. Transgenic Res, 1998. **7**(2): p. 105-12.

186. Meijerman, I., et al., *Induction of apoptosis and changes in nuclear G-actin are mediated by different pathways: the effect of inhibitors of protein and RNA synthesis in isolated rat hepatocytes*. Toxicol Appl Pharmacol, 1999. **156**(1): p. 46-55.
187. Kim, H., et al., *Post-transcriptional inactivation of p53 in immortalized murine embryo fibroblast cells*. Oncogene, 2001. **20**(25): p. 3306-10.
188. Ishigaki, Y., et al., *Evidence for a pioneer round of mRNA translation: mRNAs subject to nonsense-mediated decay in mammalian cells are bound by CBP80 and CBP20*. Cell, 2001. **106**(5): p. 607-17.
189. Buhler, M., M.F. Wilkinson, and O. Muhlemann, *Intranuclear degradation of nonsense codon-containing mRNA*. EMBO Rep, 2002. **3**(7): p. 646-51.
190. Xin, H.B., et al., *Gene trap and gene inversion methods for conditional gene inactivation in the mouse*. Nucleic Acids Res, 2005. **33**(2): p. e14.
191. Skarnes, W.C., *Two ways to trap a gene in mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(37): p. 13001-2.
192. Laird, P.W., et al., *Simplified mammalian DNA isolation procedure*. Nucleic Acids Res, 1991. **19**(15): p. 4293.
193. J. Sambrook, E.F. Fritsch, and T. Maniatis, *Molecular cloning - a laboratory manual*. 2. ed. 1989.

## 7. Anhang

### 7.1 Primer für bifunktionale Cre Expressionskonstrukte

ert2-P1 :5'ggg ggt acc gtg cgc ctg ctg gaa gat g 3'

ert2\*-P2 :5'ggg ggt acc gac tgt ggc agg gaa acc ctc tgc 3'

cre\*-P1 :5'ggg gct agc tcc aat tta ctg acc gta cac caa aat ttg  
cct gca tta ccg 3'

crefrt-P2 :5'ccc ggt acc gaa gtt cct ata ctt tct aga gaa tag gaa  
ctt cgg aat agg aac ttc atc gcc atc ttc cag cag 3'

kf5ert2\*-P1 :5'ggg gct agc cca cca tgg aag ttc cta ttc cga agt tcc  
tat tct tca aaa ggt ata gga act tcg tgc gcc tgc tgg  
aag atg gcg atg 3'

ert2\*f5-P2 :5'ggg gct agc gaa gtt cct ata cct ttt gaa gaa tag gaa  
ctt cgg aat agg aac ttc tcc gta cgc atg cat tga agt  
aga gcc cgc agt ggc caa gt 3'

pr676-P1 :5'ggg ggt acc tca cca ggt caa gac ata cag 3'

pr914-P2 :5'ggg ggt acc agc aat aac ttc aga cat cat ttc 3'

nlssv40pa-P1:5'ggg ggt acc ccc aag aag aag agg aag gtg cat atg cag  
aca tga taa gat aca ttg atg agt ttg gac aaa cc 3'

sv40frt-P2 :5'ggg ggt acc gaa gtt cct ata ctt tct aga gaa tag gaa  
ctt cgg aat agg aac ttc tac cac att tgt aga ggt ttt  
act tgc 3'

#### 7.1.1 Sequenzierungsprimer

M13forward :5'gta aaa cga cgg cca g 3'

M13reverse :5'cag gaa aca gct atg ac 3'

kcfrrt-P340 :5'gca atg ctg ttt cac tgg tta 3'

kcfrrt-P800 :5'ccc ttc cag ggc gcg agt 3'

ert2-P300 :5'gat cag gtc cac ctt cta gaa tg 3'

ert2-P600 :5'gtc ctt ctc ttc cag aga ctt c 3'



## 7.2 Primer für ET Rekombination

epxET-P1 :5'gga att gta cac tca cct ccg tgg cat ctg tgg gca ttg  
ctt gcc tgc tta gct gta gtg ggg gtt cag ctt gca cga  
tgt cca att tac tga ccg tac acc aaa att tgc c 3'

epxET-P2 :5'ggg cgt gcc ctt ggg ctc ccc ggg cgc gta ctc cac cag  
cag ctt ctg gcc ctg gta ggg gcc tta gcc aca ctc atc  
ctc acc caa cac gct gaa ggc act gcc cca ggt agg 3'

epxkol-P1 :5'agc ggc tcc ccc tga aaa tca gag c 3'

epxkol-P2 :5'ctt cag gcg cgc ggt ctg gca g 3'

epxkolneg-P2 :5'cga gac tgc ata gca gag gct aag c 3'

## 7.3 Primer für bicistronische Expressionsvektoren

cre2a-P1 :5'ggg gct agc cca cca tgc cca aga aga aga gga agg tgt  
3'

cre2a-P2 :5'ggg gga tcc gac ggg ccc ggg ttt tct tcc aca tcg ccg  
cag gtc agc agg ctg ccg cgg cct tcc gcg cga tcg cca  
tct tcc agc agg 3'

2acre-P1 :5'ccc tgt aca agc gcg cgg aag gcc gcg gca gcc tgc tga  
cct gcg gcg atg tgg aag aaa acc ccg gcc cga tgc cca  
aga aga aga gga agg tgt 3'

2acre-P1 :5'aaa gcg gcc gcc cta atc gcc atc ttc cag cag g 3'

## 7.4 Oligonukleotide für die Herstellung des Polylinkers

PL1 :5'ctg cag gca tcg atg cat atg gcg gcc gcc ata tgc atc  
gat gct gca g 3'

PL2 :5'ctg cag cat cga tgc ata tgg cgg ccg cca tat gca tcg  
atg cct gca g 3'

## 7.5 Primer für induzierbare NMD Kassetten

itgb7-P1 :5'ggg ctg cag cca act tag ggc aaa ggc aga gat gag atg  
aag gcc cta gga ggg agg ac 3'

itgb7-P2 :5'ggg gta gat ttc cac aga gag tca gtt agt tag cta gcg  
aac cag ccc tag tc 3'

itgb7-P3 :5'ggg agt ggg act agg gct ggt tcg cta gct aac taa ctg  
act ctc tgt gga aat c 3'

itgb7-P4 :5'ggg ctg cag aga tct gca ctc cga ggc ctg gtt atg ccg  
agg gag gga ctt gca cgg gg 3'

---

rb16-P1 :5'ctg cag cat cga ttt ttt act ttt agt aaa aaa ttt ttt  
tct ttt tat ag 3'

rb16-P2 :5'gcc aat aaa gac ata tga aaa agc tta gtc att cag aag  
ttt gct aaa gg 3'

rb16-P3 :5'cct tta gca aac ttc tga atg act aag ctt ttt cat atg  
tct tta ttg gc 3'

rb16-P4 :5'ctg cag cat cga tgc tcc tta acc tca cac tat c 3'

rb18-P1 :5'cca ctg cag tgg cat cga taa att cat agt act tac cat  
gtc 3'

rb18-P2 :5'cct ttg att gtt taa taa gaa agc tta gtc aaa taa agg  
tga atc c 3'

rb18-P3 :5'gga ttc acc ttt att tga cta agc ttt ctt att aaa caa  
tca aag g 3'

rb18-P4 :5'cca ctg cag tgg cat cga tta cag ttt ctt tat aga atg  
tta c 3'

rb23-P1 :5'ctg cag cat cga tgc aaa agt atc ctt tga ttg gaa aaa  
tc 3'

rb23-P2 :5'ctt cga gga atg tga gga agc tta gct agt tac ggt gac  
aag gta ggg ggc 3'

rb23-P3 :5'gcc ccc tac ctt gtc acc gta act agc taa gct tcc tca  
cat tcc tcg aag 3'

rb23-P4 :5'ctg cag cat cga tgc tag ctt att tga aat gaa gaa tg  
3'

merb23-P1 :5'ggg gcg gcc gcc tgt ctc tta tac aca tct ctg cag cat  
cga tgc aaa agt atc ctt tga ttg gaa aaa tct aat gta a  
3'

merb23-P2 :5'ggg gcg gcc gcc tgt ctc tta tac aca tct gtt taa acc  
atc gat gct agc tta ttt gaa atg aag aat gct tta t 3'

frtrb23-P1 :5' ggg gcg gcc gcg aag ttc cta ttc cga agt tca tat  
tct cta gaa agt ata gga act tcc tgc agc atc gat gca  
aaa gta tcc ttt gat tgg aaa 3'

frtrb23-P2 :5' ggg gcg gcc gcg aag ttc cta ttc cga agt tcc tat  
tct cta gaa agt ata tga act tcg ttt aaa cca tcg atg  
cta gct tat ttg aaa tga aga 3'

loxrb23-P1 :5'gcg gcc gcc aac cct cga gaa gct tat aac ttc gta taa  
tgt atg cta tac gaa cgg tac tgc agc atc gat gca aaa  
gta tcc ttt gat tgg 3'

loxrb23-P2 :5'gcg gcc gcc aac cct cga gaa gct tgt cga cta ccg ttc  
gta taa tgt atg cta tac gaa gtt atg ttt aaa cca tcg  
atg cta gct tat ttg aaa tga ag 3'

## 7.6 Sequenz des Fragments, das Erkennungssequenzen zur Rekombinase vermittelten Inversion der NMD Kassetten enthält

5'ggtagcgatcgcaacggtgtgactgatcacaattgcatatgacatgtgacagctgtctctt  
atacacatctcaaccctcgagaagcttgaagttcctattccgaagttcatattctctagaaagtat  
aggaacttcataacttcgtataatgtatgctatacgaacggtactgcagcatcgatggtttaaca  
taacttcgtatagcatacattatacgaacggtagaagttcatatactttctagagaataggaactt  
cggaataggaacttcgtcgacaagcttctcgagggttgagatgtgtataagagacagctgtcacat  
gtcatatgcaattgtgatcagtcacaacggttcgatcgccggccgcgagctc 3'

Synthetisiert durch *sloning Biotechnologie*

## 7.7 Sequenz der kombinierten induzierbaren NMD Kassetten

### 7.7.1 NMD polyA 1

5'ctgcagcatcgatgcaaaagtatcctttgattggaaaaatctaattgtaatgggtccacaaaaac  
attaaataaataatctacttttttggttttgctctagccccctaccttgtcaccgtaactagctag  
cttcctcacattcctcgaagcccttacaagtttcctagttcacccttacggattcctggagggaaac  
atctatatttcacccctgaagagtcataataaatttcagaaggtctgccaacaccaacaaaaatg  
actccaagatcaaggtgagtttggggacccttgattgttctttctttttctgctattgtaaaattca  
tgttatatggagggggcaaagttttcagggtgttggttagaatgggaagatgtcccttgatcacc  
atggaccctcatgataattttggtttctttcactttctactctgttgacaaccattgtctcctctta  
ttttcttttcattttctgtaactttttcgtaaacttttagcttgcatgtgtaacgaatttttaaat  
tcacttttggttatttgtcagattgtaagtactttctctaatacacttttttttcaaggcaatcagg  
gtatattatattgtacttcagcacagtttttagagaacaattgttataattaaatgataaggtagaa  
tatttctgcatataaattctggctggcgtggaaatattcttattggtagaacaactacatcctgg  
tcacatcctgcctttctctttatgggttacaatgatatacactgtttgagatgaggataaaatact  
ctgagtccaaaccgggccccctctgctaaccatgttcacgtccttcttcttttctacagctcctgg  
gcaacgtgctggttattgtgctgtctcatcattttggcaaagaattcactcctcagggtgcaggctg  
cctatcagaaggtggtggctggtgtggccaatgcctggctcacaataaccactgagatctttttc  
cctctgcaaaaaattatggggacatcatgaagcccttgagcatctgacttctggctaataaagga  
aatttattttcatgcaatagtgtgttggaattttttgtgtctctcactcggaaggacatatggga

gggcaaatcattttaaacaatcagaatgagtatttggttagagtttggaacatatgcccatcgat  
gctgcag 3'

Synthetisiert durch *sloning Biotechnologie*

### 7.7.2 NMD polyA 2

5'ctgcagcatcgatgcaaaagtatcctttgattggaaaaatctaataatgggtccacaaaaac  
attaaataaataatctacttttttgtttttgctctagccccctaccttgtcaccgtaactagctaa  
gcttcctcacattcctcgaagcccttacaagtttcctagttcacccttacggattcctggagggaa  
catctatatatttcacccctgaagagtcocatataaaaatttcagaaggtctgccaacaccaaaaaat  
gactccaagatcaaggttggtatcctttttacagcacaaacttaatgagacagatagaaactggtct  
tgtagaaacagagtagtcgcctgcttttctgccaggtgctgacttctctccctgggctgttttca  
ttttctcagctcctgggcaacgtgcttgagcatctgacttctggctaataaaggaaatttattttc  
attgcaatagtggttggaattttttgtgtctctcactcggaaggacatatgggagggcaaatcat  
ttaaacaatcagcatcgatgctgcag 3'

Synthetisiert durch *sloning Biotechnologie*

## 7.8 Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
Abb.	Abbildung
bp	Basenpaare
cDNA	komplementäre DNA
CHYSEL	( <i>cis-acting hydrolase element</i> )
DMEM	<i>Dulbecco`s modified eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DTA	<i>Diphtheria toxin A subunit</i>
E2	β-Östradiol
EJC	<i>exon junction complex</i>
ER	Östrogenrezeptor
ES-Zellen	Embryonale Stammzellen
EtOH	Ethanol
FCS	<i>fetal calf serum</i> = fötales Kälberserum
FRT	<i>FLP recognition target</i> = FLP Rekombinase
	Erkennungssequenz
g	Erdbeschleunigung
G418R	Geneticin (Neomycin-Derivat)
HAT	Hypoxanthin-Aminopterin-Thymin
HPRT	Hypoxanthin-phosphoribosyl-transferase
HR	homologe Rekombination
Hsp90	Hitzeschockprotein
HSV-tk	<i>Herpes Simplex Virus Typ 1 Thymidine Kinase</i>
IFN	Interferon α/β
IRES	<i>internal ribosomal entry site</i>
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilo Dalton
LBD	Liganden bindende Domäne
LIF	Leukämie inhibierender Faktor

---

loxP	<i>locus of cross-over (x) in P1</i> = Cre Rekombinase Erkennungssequenz
M	molar (mol/l)
MCS	<i>multiple cloning site</i>
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	<i>messenger RNA</i>
neo	Neomycin
ng	Nanogramm
NLS	<i>nucleus localization sequence</i> = Kernlokalisierungssignal
NMD	<i>nonsense mediated mRNA decay</i>
nt	Nukleotide
OD	Optische Dichte
4-OHT	4-Hydroxytamoxifen
ORF	<i>open reading frame</i> = offenes Leseraster
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> = Phosphat- gepufferte
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> = Polymerasekettenreaktion
polyA	Polyadenylierungssignal
PR	Progesteronrezeptor
PTC	<i>premature termination codon</i> = prämaures Terminationscodon
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde
SSR	sequenzspezifische Rekombinase
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA Elektrophoresepuffer
Tam	Tamoxifen
TE	Tris-EDTA
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
UV	ultraviolettes Licht
ü.N.	über Nacht
WT	Wildtyp

## Danksagung

Als Erstes möchte ich mich bei Herrn Dr. Werner Müller für die Bereitstellung des Themas, die Betreuung der Arbeit und die zahlreichen Diskussionen bedanken sowie dafür, dass ich an verschiedenen interessanten Tagungen teilnehmen konnte.

Herrn Prof. Dr. Jürgen Wehland danke ich für die Übernahme der Begutachtung und des Hauptreferats. Bei Herrn Prof. Dr. Stefan Dübel bedanke ich mich für die Übernahme des Korreferats sowie für die Betreuung der Arbeit als Mitglied in meinem Thesiskomitee. Herrn Prof. Dr. Martin Korte danke ich für die Bereitschaft, sich als Prüfer zur Verfügung zu stellen.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Martin Hafner für die umfassende Hilfestellung und kompetente Unterstützung bei der Herstellung von DNA Konstrukten sowie für die Hilfe bei der Lösung von Problemen.

Frau Dr. Angela Schippers danke ich ganz herzlich für viele wertvolle Ratschläge, für ihre Hilfsbereitschaft und moralische Unterstützung während der Promotionszeit.

Bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe EI bedanke ich mich für ihre große Hilfsbereitschaft und das tolle Arbeitsklima, das ein Arbeiten im Labor auch an schlechten Tagen möglich machte. Besonders danke ich an dieser Stelle Mirjam Schwarzkopf für ihre Hilfe bei der Durchführung von zahlreichen Messungen.

Danke auch an meine Mit-Doktoranden für die großartige Zeit, an die ich noch sehr lange zurückdenken werde.

Ich danke allen meinen Freundinnen und Freunden, die mich nie haben vergessen lassen, dass es auch ein Leben außerhalb des Labors gibt. Ganz besonders danke ich Jane für ihre langjährige Freundschaft.

Felix danke ich dafür, dass er immer an mich geglaubt hat.

Meiner Familie, insbesondere meinen Eltern danke ich für alles.

Mama, Tata, bardzo wam dziękuję za wszelką pomoc, za oparcie, za pociechę i za to że zawsze mogłam na was liczyć. Z waszego powodu jestem co jestem.